



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากว่านเหลียง
และว่านชักมดลูก

(Study of acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant activities from
Curcuma zedoaria Roscoe. and *Curcuma comosa* Roxb.)

โดย

นสภ. นารูยา	ปิติวิทยากุล	รหัส 59210170
นสภ. ปภาวรินทร์	วชิสิงห์	รหัส 59210174
นสภ. ฐิตียาภรณ์	ประสมทรัพย์	รหัส 59210224

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาต้านฤทธิ์เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากว่านเหลียง
และว่านชักมดลูก

(Study of acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant activities from
Curcuma zedoaria Roscoe. and *Curcuma comosa* Roxb.)

โดย

นสภ. นารูยา	ปิติวิทยากุล	รหัส 59210170
นสภ. ปภาวรินทร์	วชิสิงห์	รหัส 59210174
นสภ. ฐิตยาภรณ์	ประสมทรัพย์	รหัส 59210224

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจาก ว่านเหลียงและว่านชักมดลูก จัดทำขึ้น เนื่องจากในประเทศไทยโดยเฉพาะจังหวัดจันทบุรีเป็นแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติที่สมบูรณ์และมีพืชสมุนไพรพื้นบ้านหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยามากมายและใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชเป็นจำนวนมาก แต่พืชสมุนไพรเหล่านี้ยังขาดการศึกษาหรือมีการศึกษาน้อยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS, FRAP ทดสอบเชิงปริมาณในการหาปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขฉิวบาง ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส รวมไปถึงการศึกษาคุณสมบัติทางพิษวิทยาเคมีเบื้องต้นของพืชสมุนไพรเหล่านี้ ซึ่งผลการวิจัยและข้อเสนอแนะต่าง ๆ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เกี่ยวข้องไม่มากนักน้อยในการนำผลการวิจัยไปใช้หรือประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดความเหมาะสม ตลอดจนเกิดแนวทางในการปรับปรุงพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป และใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาต่อยอดและพัฒนาไปเป็นสมุนไพรเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์ต่อไปได้ในอนาคต

คณะผู้วิจัย

นสภ. นารุยา ปิติวิทยากุล 59210170

นสภ. ปภาวรินทร์ วจีสิงห์ 59210174

นสภ. จิตติยาภรณ์ ประสมทรัพย์ 59210224

28 มีนาคม 2564

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากว่านเหลียงและว่านชั้กมดลูก

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|---------------------|-------------|---------------|
| 1. นสภ. นารุยา | ปติวิทยากุล | รหัส 59210170 |
| 2. นสภ. ปภาวรินทร์ | วชิสิงห์ | รหัส 59210174 |
| 3. นสภ. จิตติยาภรณ์ | ประสมทรัพย์ | รหัส 59210224 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | |
|-----------------------------|
| 1. ญ.ดร.ขวัญชญาณวิศ มาชนะนา |
| 2. ผศ.ดร. ณิชกานต์ ภิระคำ |

บทคัดย่อ

ในประเทศไทยจังหวัดจันทบุรี มีพืชสมุนไพรพื้นบ้านหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ และใช้ประโยชน์ต่อสุขภาพนันทนาการ (โดยเฉพาะพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae) การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอทานอลส่วนหัวของว่านเหลียง (*Curcuma zedoaria* Roscoe.) และว่านชั้กมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ที่ยังมีข้อมูลอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นควบคู่กับการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสด้วยวิธี Ellman's method

จากการศึกษาสารประกอบทางพฤกษเคมี และทำการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือสารสกัดเอทานอลของว่านชั้กมดลูกซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 21.1 ± 3.4 g GAE/100 g extract และสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือสารสกัดเอทานอลของว่านเหลียงด้วยวิธี Soxhlet ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 12.2 ± 1.4 g QE/100 g extract และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox พบว่าสารสกัดเอทานอลของว่านชั้กมดลูกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.0 ± 4.4 μ g/mL ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH และมีค่าความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 28.9 ± 5.6 mg Fe^{2+} /100 g sample extract ในการทดสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบ ในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์โดยใช้ galantamine เป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลว่านเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 192.2 ± 9.5 ถึง 237.5 ± 16.7 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ต่ำกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ และในการทดสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นพบว่าพืชที่นำมาศึกษานั้นมีสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และอัลคาลอยด์ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารพฤษเคมีที่พบจะมีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด การศึกษาครั้งนี้ถือเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อยอดและพัฒนาเกี่ยวกับโครงสร้างเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ปวีณพ. อภ

Senior Project Academic Year 2020

Title : Study of acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant activities from *Curcuma zedoaria* Roscoe. and *Curcuma comosa* Roxb.

By

1. Miss. Nartthaya Pitiwitthayakul ID 59210170
2. Miss. Praphawarin Wajeasing ID 59210174
3. Miss. Thitiyapone Prasomsub ID 59210224

Advisor:

1. Dr. Kwanchayanawish Machana
2. Asst. Prof. Dr. Nichakan Peerakam

Faculty of Pharmaceutical sciences Burapha University

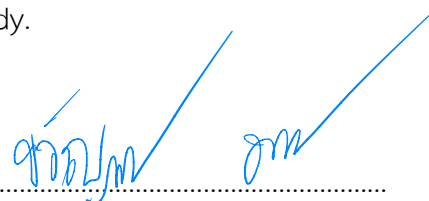
ABSTRACT

In Chantaburi province, Thailand. numerous folk medicinal plants were utilized for anti-oxidation, anti-inflammation and various health benefits. (especially for Zingiberaceae family). The study of the chemical composition of ethanolic extract of rhizome of *Curcuma zedoaria* Roscoe. and *Curcuma comosa* Roxb. effect on antioxidant and anti-Alzheimer remained limited. Therefore, the purpose of this study was to investigate the free radical scavenging and acetylcholinesterase inhibitor activities. The ethanolic extracts of *C. zedoaria* and *C. comosa* were prepare by Soxhlet and percolation method. The extracts were determined antioxidant activities by DPPH, ABTS, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay together with phytochemical compounds were determined. The thin-layer chromatography of the ethanolic extracts was evaluated. The anti-Alzheimer disease was investigated by using acetylcholinesterase inhibitor activity (Ellman's method).

According to the study of phytochemical compounds, the ethanolic extract of *C. comosa* shown highest total phenolic content at value of 21.1 ± 3.4 g GAE/100 g extract. Whereas the ethanolic extract of *C. zedoaria* (Soxhlet) shown highest total flavonoid content of 12.2 ± 1.4 g QE/100 g extract. According to antioxidant activity study by that use trolox as standard shown rhizomes of *C. comosa* extract expressed the strongest free radical

scavenging activity at the inhibition of 51.0 ± 4.4 $\mu\text{g/mL}$ in DPPH assay and 28.9 ± 5.6 mg Fe^{2+} /100 g sample extract in FRAP assay. The antioxidant activity shown relate to the total phenolic contents. Anti Alzheimer's disease of the extracts was evaluated by acetylcholinesterase inhibitor activity, the result shown ethanolic extract of *C. zedoaria* expressed the IC_{50} value at 192.2 ± 9.5 and 237.5 ± 16.7 $\mu\text{g/mL}$ while the ethanolic extract of *C. comosa*. has an inhibitor activity lower than 50% at concentration 500 $\mu\text{g/mL}$. Galantamine was used as standard positive control for acetylcholinesterase inhibitor activity. The study exhibited that the distribution of phytochemical compounds such as phenolic, flavonoids, tannins and alkaloids were different depending on plant species. These data were the basic knowledge related to anti-oxidation or anti-inflammation test for further benefits to the chemical constituents and pharmacological study.

Major Advisor.....



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ญญ.ดร.ขวัญชนก วิเศษ ภาควิชา อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย และ ผศ.ดร. นิชกานต์ ภีระคำ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยร่วมที่เป็นผู้ริเริ่ม แนวคิดงานวิจัยและกรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ คุณกนกพร ก้อนทรัพย์ เจ้าหน้าที่ผู้ช่วยนักวิจัยทางเภสัชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือ และอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องแก้ว อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ให้คำแนะนำระหว่างการทำวิจัยรวมถึง ขอขอบพระคุณชาวบ้านตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ทุกท่านที่ให้ข้อมูลต่าง ๆ ที่เอื้อต่อการ ทำงานวิจัยและการเก็บตัวอย่างพืช รวมถึงขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ในการทำงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปด้วยดี

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่า คณาจารย์ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้องและขอแสดงความกตัญญู กตเวทิตาคุณ แต่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอ น้อมรับผิดชอบเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษาเพื่อเป็นประโยชน์ในการ พัฒนางานวิจัยต่อไป

คณะผู้วิจัย

นสภ. นารุญา ปิติวิทยากุล 59210170

นสภ. ปภาวรินทร์ วชิสิงห์ 59210174

นสภ. จิตติยาภรณ์ ประสมทรัพย์ 59210224

28 มีนาคม 2564

สารบัญ

บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฅ
บทที่ 1	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 สมมติฐาน	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 กรอบแนวคิด	4
1.6 นิยามศัพท์	5
บทที่ 2	6
2.1 ข้อมูลทั่วไปของพืชสมุนไพร	6
2.1.1 ว่านชักมดลูก	6
2.1.2 ว่านเหลียง	9
2.2 โรคอัลไซเมอร์	10
2.3 อนุมูลอิสระ	11
2.3.1 ปัจจัยการเกิดสารอนุมูลอิสระ	14
2.3.2 การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ	15
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
2.4.1 งานวิจัยของพืชสกุล <i>Curcuma</i> ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	17
2.4.2 งานวิจัยของพืชสกุล <i>Curcuma</i> ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	18
2.4.3 งานวิจัยของพืชสกุล <i>Curcuma</i> ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ	19

2.5 การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง (Thin Layer Chromatography fingerprint)	21
2.6 สารพฤษเคมี	23
2.6.1 การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบพฤษเคมีในพืชวิชัย	24
2.7 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์	25
2.7.1 สารประกอบฟีนอลิก	25
2.7.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์	27
2.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	28
2.8.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	28
2.8.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	29
2.8.3 การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	30
2.9 การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	31
สารอะเซทิลโคลีน	31
2.9.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์	32
2.9.2 ตัวยับยั้งเอนไซม์	33
2.9.3 เอนไซม์ยับยั้งอื่นๆนอกเหนือจากฤทธิ์การยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	33
2.9.4 การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	34
บทที่ 3	37
3.1 ตัวอย่างสมุนไพร	37
3.2 การเตรียมสารสกัด	38
3.2.1 การเตรียมสารสกัดโดยวิธี percolation	40
3.2.2 การเตรียมสารสกัดโดยวิธี Soxhlet	41
3.3 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น	42
3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขผิวบางของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก (TLC fingerprint)	46
3.5 การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic contents)	47

3.6 การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid contents)	48
3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	48
3.7.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	48
3.7.2 การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	49
3.7.3 การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	49
3.7.4 การตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	50
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)	50
บทที่ 4	51
4.1 การสกัดสารจากพืช	51
4.2 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening tests)	54
4.3 การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือโดยวิธีแรงคเลฆผิวบางของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก (TLC fingerprint)	57
4.3.1 ว่านเหลียง	57
4.3.2 ว่านชักมดลูก	63
4.4 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม	69
4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	71
4.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	73
บทที่ 5	75
5.1 ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening tests) และการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม	75
5.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางพฤษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีแรงคเลฆผิวบาง	76
5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP	78
5.4 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	79
5.5 สรุปผลการศึกษา	80
ข้อเสนอแนะ	81

เอกสารอ้างอิง	82
ภาคผนวก	91

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ความแตกต่างของว่านชักมดลูกตัวเมียและว่านชักมดลูกตัวผู้	7
2. ตัวอย่าง reactive species (RS)	12
3. ข้อมูลการเก็บตัวอย่างว่านเหลืองและว่านชักมดลูก	38
4. ปริมาณร้อยละของสารที่สกัดได้ (% yield w/w) ของสารสกัดหยาบจากพืช	51
5. ลักษณะของสกัดเอทานอลจากส่วนเหง้าของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก	52
6. ผลการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดว่านเหลืองและว่านชักมดลูก	54
7. TLC chromatogram ของสารสกัดว่านเหลือง ระบบวิวัฒนาการเคลื่อนที่เป็น n-hexane : ethyl acetate (93:7)	57
8. TLC chromatogram ของสารสกัดว่านเหลืองที่ ระบบวิวัฒนาการเคลื่อนที่เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2)	59
9. TLC chromatogram ของสารสกัดว่านชักมดลูก ระบบวิวัฒนาการเคลื่อนที่เป็น n-hexane : ethyl acetate (93:7)	63
10. TLC chromatogram ของสารสกัดว่านชักมดลูก ระบบวิวัฒนาการเคลื่อนที่เป็น toluene: chloroform : absolute ethanol (49:49:2)	65
11. การทดสอบการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดเอทานอลของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก	70
12.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก	71
13. ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดเอทานอล ของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก	73

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. วานชักมดลูก	7
2. ความแตกต่างของวานชักมดลูกตัวเมียและตัวผู้	8
3. วานเหลือง	10
4. แหล่งของ ROS เกิดขึ้นจากภายในและนอกร่างกาย และแสดงถึงสมดุลของระบบ antioxidant	13
5. โครงสร้างโมเลกุลของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก	25
6. การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลิก	26
7. กลไกการเกิดปฏิกิริยา DPPH radical scavenging	28
8. กลไกการเกิดปฏิกิริยา ABTS radical scavenging	29
9. โครงสร้างสารมาตรฐาน trolox	30
10. กลไกการเกิดปฏิกิริยา FRAP radical scavenging	31
11. แสดงถึงความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ ที่อธิบายได้ด้วยทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ	32
12. แสดงการสลายอะเซทิลโคลีนด้วยเอนไซม์ AChE หรือ BChE	33
13. การจางลงของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิไดซ์ระหว่าง Ag ⁺ ion กับ tricholine	34
14. แสดงการเรืองแสงของ squaraine ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	35
15. กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง thiocholine และ DTNB ในการทดสอบวิธี Ellman's method	36
16. ลักษณะต้นของวานเหลืองและวานชักมดลูก	37
17. ส่วนหางสดของวานชักมดลูก	38
18. ส่วนหางสดของวานเหลือง	38
19. ส่วนหางที่หั่นแฉกและตากแห้งแล้วของวานชักมดลูก	39

20. ส่วนเหง้าที่หั่นแว่นและตากแห้งแล้วของว่านชักมดลูก	39
21. ลักษณะผงของว่านชักมดลูกก่อนทำการสกัด	39
22. ลักษณะผงของว่านเหลืองก่อนทำการสกัด	39
23. การสกัดด้วยวิธี percolation ของว่านชักมดลูก	40
24. การสกัดด้วยวิธี percolation ของว่านเหลือง	40
25. การสกัดด้วยวิธี Soxhlet ของว่านชักมดลูก	41
26. การระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator ของสารสกัด	41
27. crude extract ของสารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation	53
28. crude extract ของสารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet	53
29. crude extract ของสารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation	53
30. crude extract ของสารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet	53
31. สารสกัดว่านเหลืองที่วัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7)	58
ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm	
32. สารสกัดว่านเหลืองที่วัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7)	58
ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm	
33. สารสกัดว่านเหลืองที่วัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7)	58
ทำการพ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid	
34. สารสกัดว่านเหลืองที่วัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7)	58
พ่นน้ำยาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid	
35. สารสกัดว่านเหลืองที่วัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol	60
(49:49:2) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm	

36. สารสกัดว่านเหลืองที่วิภูภาค toluene : chloroform : absolute ethanol 60
(49:49:2) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm
37. สารสกัดว่านเหลืองที่วิภูภาค toluene : chloroform : absolute ethanol 60
(49:49:2) พ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid
38. สารสกัดว่านเหลืองที่วิภูภาค toluene : chloroform : absolute ethanol 60
(49:49:2) พ่นน้ำยาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid
39. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) 64
ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm
40. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) 64
ทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm
41. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) 64
พ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid
42. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) 64
43. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค toluene : chloroform : absolute ethanol 66
(49:49:2) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm
44. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค toluene : chloroform : absolute ethanol 66
(49:49:2) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm
45. สารสกัดว่านชักมดลูกที่วิภูภาค toluene : chloroform : absolute ethanol 66
(49:49:2) พ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid

46. สารสกัดว่านชักมดลูกวิญญากาศ toluene : chloroform : absolute ethanol	66
(49:49:2) ฟันท้ายาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid	
47. กราฟมาตรฐานของ quercetin	69
48. กราฟมาตรฐานของ gallic acid	69
49. กราฟมาตรฐานของ trolox	72

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ยุคปัจจุบันสัดส่วนประชากรของประเทศไทย มีจำนวนผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยข้อมูลจากระบบสถิติการลงทะเบียน กรมการปกครอง ณ วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2561 รายงานว่ามีผู้สูงอายุเป็น 16.06% ของจำนวนประชากร (1) เนื่องจากผู้สูงอายุมีร่างกายที่เสื่อมสภาพไปตามวัย ดังนั้นภาวะโรคเรื้อรังจึงเป็นโรคส่วนใหญ่ที่มักพบได้ในผู้สูงอายุ เช่น โรคเบาหวาน ความดัน ไขมัน มะเร็ง และอัลไซเมอร์ เป็นต้น โรคเหล่านี้เป็นโรคที่รบกวนการใช้ชีวิตประจำวัน และจำเป็นจะต้องได้รับการรักษาเป็นระยะเวลานานและต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่องเพื่อควบคุมอาการ หากยิ่งผู้สูงอายุมีอัตราการเจ็บป่วยด้วยโรคเรื้อรังมากเพียงใดก็จะยิ่งเสี่ยงต่อการเสียชีวิตมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคสมองเสื่อมและมีโอกาสพบมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น โดยพบความชุกของภาวะสมองเสื่อมในผู้สูงอายุ ร้อยละ 12 พบว่าความชุกในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายคิดเป็นร้อยละ 15 และพบเกิดขึ้นในผู้ชายร้อยละ 10 จากการคาดการณ์ขององค์กรอนามัยโลก กล่าวว่าจะมีประชากรที่มีปัญหาภาวะสมองเสื่อมทั่วโลกเพิ่มสูงขึ้น 2 เท่าในทุก ๆ 20 ปี โดยจะมีจำนวน 47 ล้านคนในปี พ.ศ. 2558 และอาจเพิ่มเป็น 76 ล้านคน ในปีพ.ศ. 2573 และอาจเพิ่มเป็น 135 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2593 จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้เห็นว่าสถานการณ์ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ อาจกลายเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของสังคมผู้สูงอายุของประเทศไทยในอนาคตอันใกล้ ดังนั้นการศึกษากการป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์จึงมีความสำคัญ (2)

โรคอัลไซเมอร์นั้นมีสมมติฐานการเกิดโรคหลายสาเหตุ โดยมีสมมติฐานว่าเกิดจากสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนลดลง (3) นอกจากนี้ยังมีสารอนุมูลอิสระซึ่งทำให้เกิด oxidative stress ที่ทำให้เกิดความผิดปกติของ tau protein (4) กลายเป็นภาวะที่สมองทำงานได้น้อยลง ส่งผลต่อความคิดและความจำในระยะสั้นหรืออาจจะสูญเสียทั้งความทรงจำในระยะสั้นและระยะยาวได้หากมีอาการรุนแรง โดยแนวทางการรักษาด้วยยาแผนปัจจุบันคือ ต้องเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนหรือหาวิธีการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ปัจจุบันยาที่ใช้ในการต้านเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ donepezil, rivastigmine, galantamine, tacrine และ memantine โดยยาเหล่านี้มีกลไกช่วยเพิ่มปริมาณอะเซทิลโคลีนนอกจากนี้การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระยังมีส่วนช่วยในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้เช่นกัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีฤทธิ์ป้องกันการเกิด oxidative damage จากสารอนุมูลอิสระและยังช่วยเสริมการทำงานของอะเซทิลโคลีนผ่านการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสอีกด้วย (5)

นอกจากยาแผนปัจจุบันแล้ว ยังมีการใช้สมุนไพรมาใช้ในการป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ พรหมมี (*Bacopa monnieri* Wettst) ซึ่งพบกลุ่มสาร ไตรเทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และบาโคไซด์ ใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L.) มีสารสำคัญคือ กิงโกโลด์ รากของต้นโสนน้อย (*Chamaecrista mimosoides* (L.) Greene) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส กูดชน (*Lycopodium clavatum* L.) ที่มีสารสำคัญคือ ไตรเทอร์พีนอยด์ ว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) ที่มีสารสำคัญคือ alpha-asarone, beta-asarone ใบบัวบก (*Centella asiatica* L.) ที่พบสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน และอัลคาลอยด์ (6)

ถึงแม้สมุนไพรที่กล่าวมาข้างต้นจะมีฤทธิ์ในป้องกันโรคอัลไซเมอร์และเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย แต่จำนวนประชากรผู้สูงอายุที่เป็นโรคอัลไซเมอร์นั้นยังมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นทุกปี การแพทย์และสาธารณสุขจำเป็นต้องมีการรับมือกับโรค โดยใช้แนวทางส่งเสริมสุขภาพและการป้องกันโรคให้กับผู้สูงอายุจากสมุนไพร โดยมีรายงานศึกษาวิจัยพบว่าสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ จิง (*Zingiber officinale* Roxb.) มีรายงานพบกลุ่มสาร polyphenolics ที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และยังมีฤทธิ์ต้านการเกิด amyloid plaques (7) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีงานวิจัยระบุว่า สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ซึ่งเป็นสารผสมที่ประกอบไปด้วย curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ และยังมีฤทธิ์ต้านการเกิด amyloid plaques และ neurofibrillary tangles (6) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกหลายฉบับที่ระบุว่าสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิด oxidative stress และลดการสลายอะเซทิลโคลีนที่บริเวณ synaptic cleft เพื่อให้มีปริมาณอะเซทิลโคลีน คงอยู่มากขึ้น อีกทั้งพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae ก็พบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย และถูกนำมาใช้ในการปรุงอาหารและเป็นยารักษาในตำราแพทย์แผนไทยอยู่บ่อยครั้ง ดังนั้นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ที่นอกเหนือจากการศึกษาและรายงานในข้างต้น อาจจะมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้กลุ่มผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ ว่านเหลียง (*C. zedoaria* Roscoe.) และว่านชักมดลูก (*C. comosa* Roxb.) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถปกป้องเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจาก oxidative stress ได้ (8,9) โดยในการศึกษาจะทำการตรวจสอบกลุ่มสารพฤษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้งสองชนิดในหลอดทดลอง (*in-vitro*) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาต่อยอดและพัฒนาไปเป็นสมุนไพรเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต นอกจากนี้ยังเป็นการสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในสาธารณสุขมูลฐานในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของว่านเหลียง (*C. zedoaria* Roscoe.) และว่านชักมดลูก (*C. comosa* Roxb.)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจากสารสกัดหยาบของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก

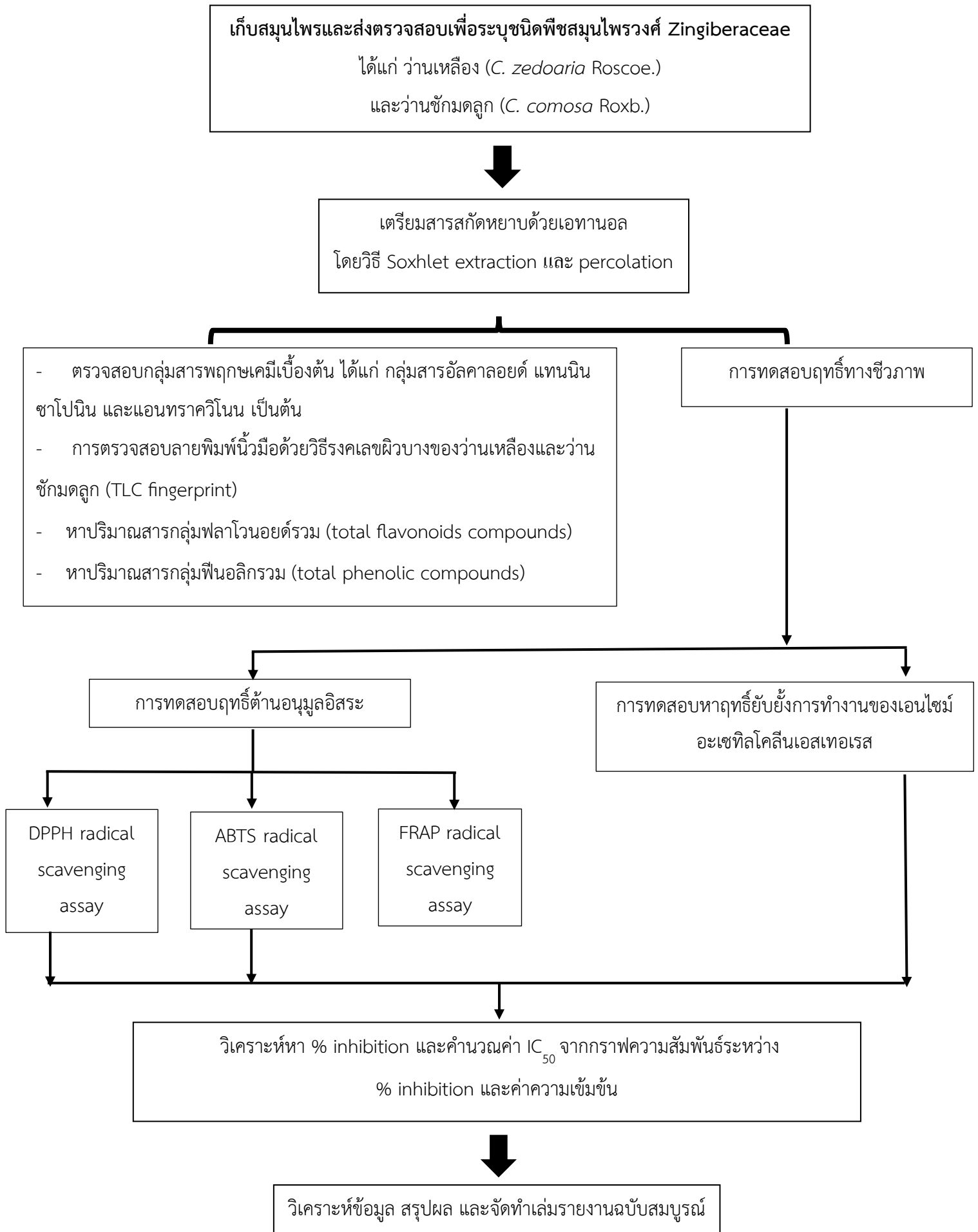
1.3 สมมติฐาน

สารสกัดเอทานอลจากว่านเหลียงและว่านชักมดลูกมีสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ดังเช่นสมุนไพรรูปอื่นในวงศ์ Zingiberaceae ที่มีการรายงานมาแล้ว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลุ่มสารที่พบในสารสกัดว่านเหลียงและว่านชักมดลูก
2. ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากว่านเหลียงและว่านชักมดลูก ที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
3. สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาต่อยอดสมุนไพรรูปทั้ง 2 ชนิด สำหรับใช้ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุในอนาคตได้

1.5 กรอบแนวคิด



1.6 นิยามศัพท์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) คือ โรคในกลุ่มโรคสมองเสื่อม (neurodegenerative disease) ที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มผู้สูงอายุโดยจะส่งผลกระทบในด้านความจำเป็นหลัก อาการที่พบได้บ่อยคือ ผู้ป่วยจะมีอาการหลงลืมวัน เวลา สถานที่หรือกิจกรรมที่ทำเป็นประจำ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารประกอบที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของการเกิดอนุมูลอิสระเพื่อไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย

สารยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs) คือ สารที่ยับยั้งเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของอะเซทิลโคลีน ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อความจำ หากสารอะเซทิลโคลีนมีปริมาณน้อยลงจะส่งผลให้เกิดภาวะสมองเสื่อมได้

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ ว่านเหลียง (*C. zedoaria* Roscoe.) และว่านชักมดลูก (*C. comosa* Roxb.) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย และมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงได้จัดทำ การทบทวนวรรณกรรมขึ้นมาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและดำเนินงานวิจัย

2.1 ข้อมูลทั่วไปของพืชสมุนไพร

2.1.1 ว่านชักมดลูก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma comosa* Roxb.

ชื่อพ้อง : ว่านทรหด ว่านพระยาหัวศึก ว่านการบูรเลือด

อาณาจักร : Plantae

หมวด : Magnoliophyta

ชั้น : Commelinids

อันดับ : Zingiberales

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

1) ข้อมูลทั่วไปของว่านชักมดลูก (10)

ไม้ล้มลุกเนื้ออ่อนสูง 40-60 เซนติเมตร มีเหง้าใต้ดิน หัวเจริญในฤดูฝนและแห้งในฤดูหนาว หัวรูปกลมโต ป้อม เนื้อในสีขาว ใบมี 1-2 ใบ กลางใบ มีแถบสีแดงเข้ม ผิวใบทั้งสองด้านเกลี้ยง มีต่อมเล็กสีน้ำตาลแดงกระจายอยู่ทั่วไปทั้งสองด้าน กาบใบยาว 13-15 เซนติเมตร แผ่นใบรูปไข่แกมหอก กว้าง 8-11 เซนติเมตร ยาว 22-36 เซนติเมตร กระจุกใบประดับ (coma bract) มีขนาดกว้าง 1.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร และมีสีชมพูเข้มทั่วทั้งแผ่น ใบประดับ ช่อดอก เจริญจากโคนลำต้น ก้านช่อดอกสั้น ช่อดอกกว้าง 6-7 เซนติเมตร ยาว 13-15 เซนติเมตร ใบประดับรูปไข่แกมหอก พบตามป่าเบญจพรรณและป่าชื้นทั่ว ๆ ไป ต้นว่านชักมดลูกแสดงดังภาพที่ 1

นอกจากนี้ว่านชักมดลูกยังมีอีก 2 สายพันธุ์ที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันอันได้แก่ ว่านชักมดลูกตัวผู้ (*C. latifolia* Rosc.) และ *C. elata* Roxb. ซึ่งแสดงข้อมูลดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2

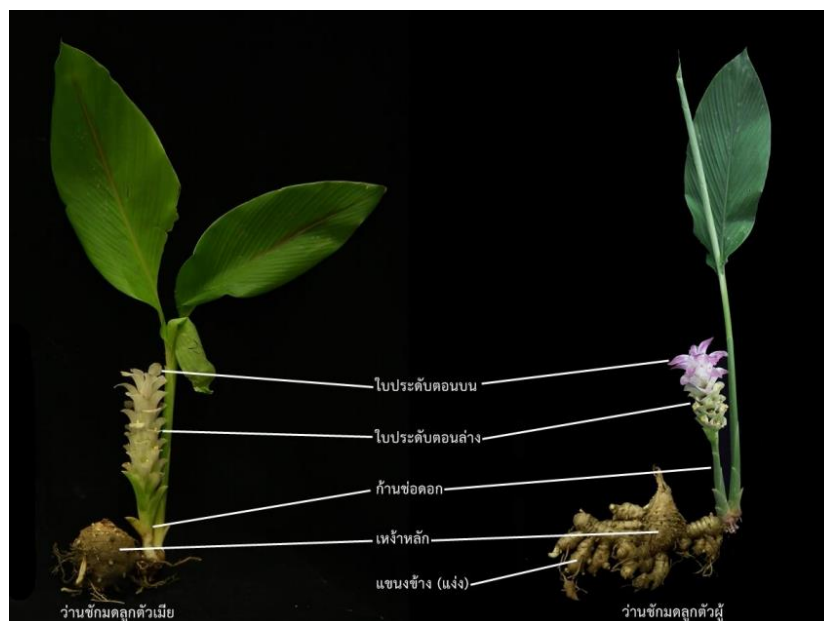


ภาพที่ 1 : ว่านชักมดลูก (*C. comosa*) (11)

ตารางที่ 1 : ความแตกต่างของว่านชักมดลูกตัวเมียและว่านชักมดลูกตัวผู้ (12)

ส่วนของพืช	ชนิดพืช		
	<i>C. comosa</i> Roxb.	<i>C. elata</i> Roxb.	<i>C. latifolia</i> Rosc.
ลำต้นใต้ดิน	- หัวกลมแป้นรูปปรีหรือรูปไข่ - แฉกสั้นและโค้งขึ้นแนบกับเหง้าหลัก - เนื้อด้านละเอียด สีขาวนวล วงด้านในมีสีชมพูเรื่อๆ - กลิ่นอ่อน ๆ คล้ายมะม่วงมัน	- หัวหลักรูปปรีหรือรูปกลม แฉกยาวและทำมุมเกือบตั้งฉากกับเหง้าหลัก - เนื้อด้านเห็นเส้นใยชัดเจน สีขาว หรือเหลืองนวล วงด้านในออกสีเขียวแกมเทา	- หัวหลักรูปปรีหรือรูปกลม - แฉกยาวและทำมุมเกือบตั้งฉากกับเหง้าหลัก โค้งเล็กน้อย - เนื้อด้านเห็นเส้นใยชัดเจน สีขาว หรือเหลืองนวล วงด้านในออกสีเขียวแกมเทา
ใบ	ใบสีเขียว เรียบ ไม่มีขน เส้นกลางใบสีเขียว หรือ	ใบสีเขียว ท้องใบมีขนสั้นนุ่ม เส้นกลางใบเขียว	ใบสีเขียว ท้องใบมีขนสั้นนุ่ม เส้นกลางใบสีแดง

ส่วนของพืช	ชนิดพืช		
	<i>C. comosa</i> Roxb.	<i>C. elata</i> Roxb.	<i>C. latifolia</i> Rosc.
	อาจมีสีม่วงแดง และมักจะจางลงในภายหลัง		
ก้านช่อดอก	ยาว 2-5 เซนติเมตร	ยาว 10-25 เซนติเมตร	ยาวได้ถึง 30 เซนติเมตร
ใบประดับตอนบนช่อดอก	- ขนาดใกล้เคียงกับใบประดับล่าง - สีขาว มีแถบสีชมพูตอนกลางใบประดับ หรือมีใบประดับสีขาว หรือสีชมพูเข้มทั้งหมด	- ขนาดใหญ่กว่าใบประดับล่าง ชัดเจน - สีชมพูอมม่วง หรือชมพูเข้มทั้งกลีบ	- ขนาดใหญ่กว่าใบประดับล่าง ชัดเจน - สีชมพูอมม่วง หรือชมพูเข้มทั้งกลีบ
ใบประดับตอนล่างช่อดอก	สีขาว มีแต้มสีชมพูอ่อนถึงชมพูเข้ม ตอนปลายกลีบ	สีเขียวอ่อน ปลายแต้มสีม่วงแดง	สีเขียวอ่อน ปลายแต้มสีม่วงแดง



ภาพที่ 2 : ความแตกต่างของว่านชักมดลูกตัวเมีย (*C. comosa*) และตัวผู้ (*C. latifolia*) (13)

2.1.2 ว่านเหลียง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe. หรือ *Curcuma zedoaria* Roscoe. (14)

ชื่อพ้อง : ขมิ้นอ้อย(กลาง) ขมิ้นชัน(เหนือ) แห้วดำ(เชียงใหม่) ละเมียด(เขมร) ขมิ้นเจดีย์ ขมิ้นอ้อย ขมิ้นหัวขึ้น
และสากกะเปือยละว้า

อาณาจักร : Plantae

หมวด : Magnoliophyta

ชั้น : Liliopsida

อันดับ : Zingiberales

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

1) ข้อมูลทั่วไปของว่านเหลียง (15)

ว่านเหลียงหรือต้นขมิ้นอ้อยจัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกมีอายุหลายปีที่มีเหง้าอยู่ใต้ดินและมีรากเล็กน้อยที่บริเวณเหง้า มีลักษณะทั่วไปคล้ายกับขมิ้นชันแต่มีลำต้นที่สูงกว่า ขนาดเหง้าและใบใหญ่กว่า โดยว่านเหลียงจะมีความสูงประมาณ 1-1.2 เมตร เหง้ามักโผล่ขึ้นมาเหนือดินเล็กน้อยเหมือนเจดีย์ทรงกลมสูงหลายชั้นๆ ลักษณะของเหง้ามีลักษณะเป็นรูปกลมรี มีความยาวประมาณ 18-24 เซนติเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7-11 เซนติเมตร ผิวด้านนอกเป็นสีขาวอมเหลือง ส่วนเนื้อในเป็นสีเหลืองอ่อน หรือสีเหลืองเข้ม ใบว่านเหลียงเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับรอบลำต้น ลักษณะของใบเป็นรูปใบหอกแกมรูปขอบขนาน ปลายใบ เรียวแหลม โคนใบแคบ ก้านใบเป็นกาบหุ้มกับลำต้น กลางก้านเป็นร่องลึกตลอดความยาว ดอกว่านเหลียงออกดอกเป็นช่อ ก้านดอกจะยาวและพุ่งออกมาจากเหง้าที่อยู่ใต้ดิน ช่อดอกมีความยาวประมาณ 14 เซนติเมตร ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ช่อดอกมีใบประดับ และดอกเป็นสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน กลีบดอกมีลักษณะกลมเป็นรูปไข่สีเขียว ตรงปลายของช่อดอกจะเป็นสีชมพูหรือสีแดงอ่อน แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 : ว่านเหลื่อง (*C. zedoaria*) (16)

2.2 โรคอัลไซเมอร์ (17,19)

เป็นภาวะสมองเสื่อม (dementia) ชนิดหนึ่ง เกิดจากการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนซึ่งมีหน้าที่นำคำสั่งจากสมองไปยังอวัยวะเป้าหมายเพื่อให้เกิดกระบวนการทำงานของอวัยวะนั้นๆ และมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อระบบความจำในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำ (memory) ร่วมกับการเรียนรู้ การคิด และการสื่อสาร โดยพบว่าผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีระดับของสารอะเซทิลโคลีนลดลงอย่างมาก ซึ่งเชื่อว่าเป็นเหตุทำให้ความสามารถในการจำและการใช้เหตุผลของผู้ป่วยลดลงตามไปด้วย ปริมาณสารอะเซทิลโคลีนนี้ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยอะเซทิลโคลีนทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ดังนั้น เป้าหมายสำคัญของการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน

โดยสมมติฐานการเกิดโรคอัลไซเมอร์นั้นมีอยู่ 3 สมมติฐานคือ

1. เกิดจากปริมาณสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนลดลง โดยมีได้หลายสาเหตุ เช่น ปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเพิ่มมากขึ้น เกิดการตายของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่ผลิตสารอะเซทิลโคลีน เป็นต้น
2. เกิด amyloid plaque ซึ่งเป็นการสะสมของสาร β -amyloid peptide ภายนอกเซลล์ประสาท ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีการรายงานว่าจุดเริ่มต้นของการเกิดภาวะสมองเสื่อมคือ การเกิดเส้นใย $A\beta$

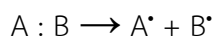
(fibrillar A β) โดยไปกระตุ้น microglia ให้ปลดปล่อย inflammatory mediators ออกมา และการสะสมของ amyloid plaque ที่มากเกินไปจนเกิดความเป็นพิษจะมีผลกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน tau จนกลายมาเป็น neurofibrillary tangles ซึ่งจะทำให้เซลล์ประสาททำงานผิดปกติ จนนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท และเมื่อ plaque สลายจะให้สารอนุมูลอิสระออกมา ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์สมอง เกิดการทำลายเซลล์ประสาทขึ้นอีกในลำดับถัดไป

3. เกิด oxidative stress จากสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ oxidisable polyunsaturated fatty acids ของสมอง ทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ประสาท (20)

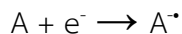
2.3 อนุมูลอิสระ (21)

อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน เกิดขึ้นเมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือ โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส (homolysis)



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



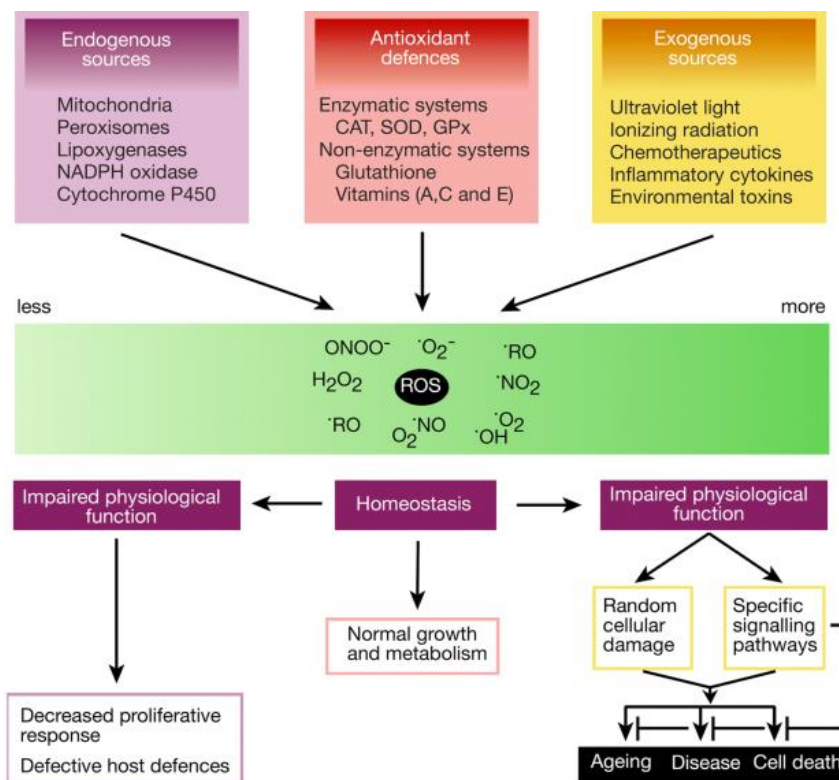
สารที่มีความสามารถ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายได้นั้น เรียกว่า reactive species (RS) ดังตารางที่ 2 ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species (RCS) และ reactive nitrogen species (RNS) ตามโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้

ตารางที่ 2 : ตัวอย่าง reactive species (RS) ซึ่งแบ่งตามโมเลกุลที่เกิด oxidation และแบ่งย่อยตามลักษณะการเป็น radical ของโมเลกุล (21)

Reactive species (RS)	
Reactive oxygen species (ROS)	
Free radicals	Non-radicals
Oxygen radical ($O_2^{\bullet}$)	Singlet oxygen ($^1O_2^*$)
Superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$)	Hydrogen peroxide (H_2O_2)
Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$)	Ozone (O_3)
Hydroperoxyl radical ($HO_2^{\bullet}$)	Organic peroxide ($ROOH$)
Peroxyl radical ($RO_2^{\bullet}$)	
Alkoxy radical ($RO^{\bullet}$)	
Carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$)	
Reactive chlorine species (RCS)	
Free radicals	Non-radicals
Chlorine radical ($Cl^{\bullet}$)	Hypochloric acid ($HOCl$)
	Nitryl chloride (NO_2Cl)
	Chlorine gas (Cl_2)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Free radicals	Non-radicals
Nitric oxide radical ($NO^{\bullet}$)	Nitric oxide (HNO_2)
Nitrogen dioxide radical ($NO_2^{\bullet}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
	Peroxynitrous acid ($ONOOH$)
	Nitryl chloride ($NOOCl$)

เมื่อโมเลกุลของ oxygen รับอิเล็กตรอนมาจากโมเลกุลอื่น เช่น โลหะหนัก (Fe, Cu) หรือ lipid free radical จะเกิดเป็น superoxide radical anion ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงกว่า oxygen และพร้อมที่จะเปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide และ hydroxyl radical ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อโมเลกุล oxygen ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จะเกิดเป็น singlet oxygen ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงกว่า superoxide radical anion อีกด้วย และอีกทั้ง ROS เหล่านี้นั้น สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายและนำไปสู่การเกิดน้ำ (H_2O) ซึ่งน้ำนั้นคือ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการเกิดปฏิกิริยาของ ROS นั้นเอง (21)

Reactive oxygen species (ROS) นั้น สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายกระบวนการภายในร่างกาย ดังนี้ การเผาผลาญสารต่างๆ อาหาร การหายใจระดับเซลล์ กระบวนการสร้างพลังงาน รวมทั้งเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยถ้าหากภายในร่างกายนั้น มีกระบวนการต่าง ๆ ดังที่กล่าวไปนี้มากเกินไป หรือแม้แต่การที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระนั้น ทำให้เกิดการสะสมของ ROS ที่มากยิ่งขึ้น และทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้ โดยที่ถ้าหากภาวะ oxidative stress นั้น เกิดขึ้นภายในระยะเวลาสั้น ๆ ก็จะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก (22) แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน จะทำให้ยิ่งมีความเสี่ยงที่จะไปมีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมไปถึง DNA จนนำไปสู่โรคในระบบต่างๆ หลายระบบและทำให้เกิดความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ ได้ ยกตัวอย่างเช่น โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด (23,24) และจากการศึกษา พบว่าภาวะ oxidative stress นั้นเป็นสาเหตุของโรค และร่างกายจะมีภาวะนี้เมื่อเป็นโรคบางอย่าง ซึ่งภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรคเหล่านี้ให้เห็นได้ชัด แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 : แหล่งของ ROS เกิดขึ้นจากร่างกายและนอกร่างกาย และแสดงถึงสมดุลของระบบ antioxidant

2.3.1 ปัจจัยการเกิดสารอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากสาเหตุต่างๆ โดยแบ่งออกได้เป็น 2 แหล่ง ดังนี้ (26)

1. ปัจจัยภายในร่างกาย (endogenous sources)

ROS ที่เกิดขึ้นผ่านกระบวนการภายในร่างกาย มีดังนี้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) ยกตัวอย่างเช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมันที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่วน ROS ที่เกิดขึ้นผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง โดยภายในร่างกายมีเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ ได้แก่

1. เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase : XO) จะทำการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน hypoxanthine เป็น xanthine และแซนทีนเป็นกรดยูริก (uric acid) พร้อมกับการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปให้ออกซิเจน จนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine)

2. เอนไซม์ไลโปออกซิจีเนส (lipoxygenase: LOX) นั้น โครงสร้างภายในโมเลกุลของเอนไซม์นี้ จะมีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งทำหน้าที่ในการดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮดรอกซีเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

ต่อมา ROS ที่เกิดขึ้นผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว จะมีกลไกดังนี้ คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) ส่วนโลหะทรานซิชัน (transition metal) 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีทั่วไปในร่างกายนั้น สามารถที่จะเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล จากซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

2. ปัจจัยภายนอกในร่างกาย (exogenous sources)

ปัจจัยแวดล้อมที่มีส่วนในการกระตุ้นให้เกิด ROS ได้ มีดังนี้ ยารักษาโรค โดยเฉพาะยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็งเนื่องจากมีฤทธิ์ที่เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (pro-oxidation) ต่อมาเป็นปัจจัยแวดล้อมที่มีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิด ROS คือ การใช้รังสีรักษาโรค เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายได้ จากการที่มีการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำภายในเซลล์ ทำให้โมเลกุลออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์เกิดปฏิกิริยาได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น ต่อมาควันทูมอร์ รวมทั้งสารมลพิษ เกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เป็นผลพลอยได้ เมื่อถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการโดยการทำงานของเอนไซม์ CYP 450 และโอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูง ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสงนั่นเอง

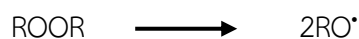
2.3.2 การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรก คือ ขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น ขั้นตอนนี้ เรียกว่า ขั้นตอนอินิทิเอชัน (initiation step) ต่อมาขั้นที่สอง คือ ขั้นที่อนุมูลอิสระมีการถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อไป เรียกขั้นตอนนี้ว่า ขั้นพวพาเกชัน (propagation step) และในขั้นสุดท้าย จะเรียกขั้นตอนนี้ว่า ขั้นเทอร์มิเนชัน (termination step) ซึ่งขั้นนี้เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล และได้สารที่มีความเสถียร ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตในสภาวะปกติ เป็นดังต่อไปนี้

1. ขั้นอินิทิเอชัน (chain initiation) อนุมูลอิสระเกิดมาจากกลไกต่างๆ กันได้หลายวิธี ซึ่งก็คือ การแตกพันธะของโมเลกุล (homolysis) การแตกหักพันธะจากแสง (photolysis) การแตกหักของพันธะผลของรังสี (radiolysis) หรือมาจากปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) ซึ่งปฏิกิริยาทั้ง 4 จัดเป็นกลไกพื้นฐานในการสร้างอนุมูลอิสระจากสารอินทรีย์

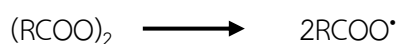
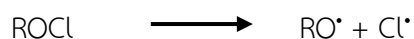
ก. การแตกพันธะของโมเลกุล (bond homolysis)

สภาวะอุณหภูมิปกติ การที่อิเล็กตรอนวงนอกสุดเป็นจำนวนคู่แล้วในพันธะโควาเลนต์นั้น สามารถแยกออกจากกันไปได้ และการที่จะให้อะตอมแต่ละตัวได้นั้น จำต้องเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานระหว่างพันธะที่อ่อนมาก ยกตัวอย่าง การแตกพันธะของโมเลกุล (bond homolysis) แสดงดังสมการนี้



ข. การแตกหักพันธะจากแสง (photolysis)

การแตกพันธะของโมเลกุลจากการดูดพลังงานแสงนั้น ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตนั้น พลังงานแสงจะถูกดูดโดยโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง และหลังจากดูดพลังงานแสงแล้วจะทำให้โมเลกุลอยู่ใน excited state ดังนั้น จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงาน เพื่อที่จะให้โมเลกุลกลับเข้าสู่สถานะ ground state ดั้งเดิม และวิธีการคายพลังงาน เช่น การแตกพันธะของโมเลกุล เกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว ดังนี้



ค. การแตกหักของพันธะผลของรังสี (radiolysis)

พลังงานจากรังสีต่างๆ ทำให้เกิดการแตกของพันธะโควาเลนต์ของโมเลกุลสารได้ ยกตัวอย่างเช่น หากโมเลกุลน้ำเกิดการแตกของพันธะ จะได้เป็นอนุมูลประจุบวก (H_2O^{+}) และอนุมูล hydroxyl ($\text{HO}^{\bullet}$) อนุมูลอิสระทั้งสองนี้ มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ได้สูง จึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระออกมามากมาย อีกทั้งรังสียังสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรง จากสารองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์อีกด้วย

ง. ปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox)

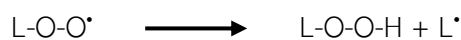
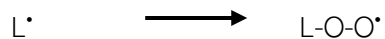
ปฏิกิริยารีดอกซ์ สามารถเรียกอีกอย่างได้ว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยา ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันบางชนิดนั้นมีประโยชน์ แต่ในอีกทางหนึ่งก็มีบางปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่สามารถทำให้เกิดความเสียหายได้ โดยสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

2. ขั้นพรอพาเกชัน (chain propagation) เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระนั้น มีการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินต่อ ๆ กันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา ยกตัวอย่างปฏิกิริยาในขั้นนี้ เช่น การเติมอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของไขมัน (lipid peroxidation) แสดงดังสมการ

Chain initiation :



Chain propagation :



Chain termination :



3. ขั้นเทอร์มิเนชัน (chain termination) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

ประกอบด้วยกลไกหลัก 3 ชนิด คือ

ก. การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ (homolinking and cross-linking of radicals) เป็นอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลมารวมตัวกัน โดยนำอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่แต่ละโมเลกุลอนุมูลอิสระมาสร้างพันธะกัน และได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ ซึ่งถ้าอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลที่เป็นชนิดเดียวกันมารวมตัวกัน จะเรียกโมเลกุลสารใหม่ที่ได้ว่า homodimer แต่ถ้าเป็นอนุมูลอิสระต่างชนิดกันมารวมตัวกัน จะเรียก heterodimer กลไกนี้ คือ ปฏิกิริยาที่สำคัญในการสร้างสารชีวโมเลกุลที่มีความเสถียรขึ้นมาใหม่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนและไขมัน เป็นต้น ซึ่งการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระแสดงได้ ดังต่อไปนี้



ข. การกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) สามารถกระทำได้ โดยสารกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า scavenger หรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ยกตัวอย่างเช่น สารประกอบฟีนอลิกซึ่งจัดเป็น radical scavenger ที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งวิตามินซี วิตามินอีและวิตามินเอ เป็นต้น

ค. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer) เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุลหรือเป็นการรับเอาอิเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างอยู่ในโมเลกุล ทำให้สภาวะการเป็นอนุมูลอิสระหมดไป ยกตัวอย่างเช่น อนุมูล superoxide เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนปกติ (O_2) เป็นต้น

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการรวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่ามีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์และอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ ของพืชในสกุล *Curcuma* ดังนี้

2.4.1 งานวิจัยของพืชสกุล *Curcuma* ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 2014 Rahman และคณะ (27) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของใบว่านเหลียงอบแห้ง (*C. zedoaria*) ด้วยวิธีทดสอบ DPPH พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ $17.56 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$ และในการทดสอบ superoxide radicals scavenging activities พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของว่านเหลียงนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูล superoxide ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ $23.47 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$

ในปี 2003 Mau และคณะ (28) ได้ทำการสกัดแก่น้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง (*C. zedoaria*) โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ สกัดด้วยตัวทำละลาย และแยกสารออกเป็น fraction โดยการทำให้ column chromatography จากนั้นทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย 3 วิธีการทดสอบ ได้แก่ TBARS แสดงผลลัพธ์เป็น % Inhibition of peroxidation เท่ากับ 46.3–73.1% ที่ความเข้มข้น 10-20 mg/ml, DPPH แสดงผลลัพธ์เป็นร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ 12.1-90.0 % เมื่อให้ในขนาด 0.1-15 mg/ml และ Chelating effects on ferrous ions แสดงผลลัพธ์เป็นค่า % Chelating effect เท่ากับ 23.2% ที่ความ

เข้มข้น 20 mg/ml ตามลำดับพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียงนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ดีแต่มีฤทธิ์ chelating on ferrous ion ที่ต่ำ

ในปี 2009 Jariyawat และคณะ (29) ได้ทำการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลของเหง้าว่านชักมดลูก (*C. comosa*) ในสัตว์ทดลอง พบว่า มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทำการศึกษาโดยใช้วิธี free reducing/antioxidant (FRAP) การศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดชั้นเอทานอลและสารออกฤทธิ์ 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol โดยเหนี่ยวนำไตของหนูให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย cisplatin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่หากใช้ขนาดสูงจะมีผลต่อการทำลายตับและไต พบว่าสารสกัดและสาร 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยลดการเกิดปฏิกิริยาไลปิดเปอร์ออกซิเดชันในไต อีกทั้งยังทำให้สารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชันของร่างกาย ได้แก่ glutathione, glutathione peroxidase ที่ลดลงจากภาวะเครียดออกซิเดชันกลับคืนสู่ระดับปกติ และการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพื่อใช้ป้องกันและรักษาโรคตาเสื่อมในวัยสูงอายุ (age-related macular degeneration) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสาร (3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol และสาร 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol พบว่าสาร 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol เป็นสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและเพิ่มเอนไซม์กำจัดสารจากการออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยง human retina epithelial cell (ARPE-19) โดยกระตุ้นกลไกการต้านออกซิเดชันของเซลล์เอง (antioxidant defense mechanism) (30) นอกจากนี้สารไดแอริลเฮปตานอยด์เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแล้วยังพบว่าโปรตีนจากเหง้าของว่านชักมดลูกก็แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นกัน (31)

2.4.2 งานวิจัยของพืชสกุล *Curcuma* ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ในปี 2009 Ahmed และคณะ (32) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และฤทธิ์เสริมความจำของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ได้แก่ curcumin, bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ในหมิ่นชัก โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสควบคู่ไปกับการทำ Morris water maze test เพื่อดูว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์จะมีผลต่อความจำของหนูหรือไม่ ปรากฏว่าการให้สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ สามารถยับยั้งการสลายตัวของสมองส่วนหน้า และส่วนฮิปโปแคมปัสได้เมื่อให้ในขนาด 3-10 mg/kg และมีฤทธิ์เสริมความจำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อให้ในขนาด 10 mg/kg จากการศึกษาทั้ง *in-vitro* และ *ex-vivo* สรุปว่าสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ยกเว้น curcumin นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส แต่ curcumin ยังมีฤทธิ์เสริมความจำเทียบเท่ากับสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ตัวอื่น ๆ จึงสรุปได้ว่าสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ตัวอื่น ๆ นั้นมีความเหมาะสมในการใช้เป็นยาป้องกันโรคอัลไซเมอร์มากกว่า curcumin

ในปี 2016 Lupreechaset และคณะ (33) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าของว่านชักมดลูก (*C. comosa*) ด้วยเฮกเซนและเอทานอลต่อสมรรถนะของเอนไซม์โคลีนอะซิติลทรานสเฟอเรส และอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในสมองของหนูขาว ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลทั้งสองขนาด (ขนาด 250, 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) มีผลเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์โคลีนอะซิติลทรานสเฟอเรสในสมองส่วน cerebral cortex และฮิปโปแคมปัส แต่ไม่มีผลต่อสมองส่วน basal forebrain สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในสมองของหนูขาวทั้ง 3 ส่วน และ estradiol ในขนาดที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์โคลีนอะซิติลทรานสเฟอเรสและอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในสมองของหนูขาว สารสกัดว่านชักมดลูกที่ทำการสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลทั้ง 2 ขนาด มีผลเพิ่มระดับ estradiol ในเลือดของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้แนวโน้มว่าสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลอาจมีประโยชน์ต่อระบบประสาทโคลิเนอร์จิกโดยการเพิ่มสมรรถนะเอนไซม์โคลีนอะซิติลทรานสเฟอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างอะซิติลโคลีนในสมอง

2.4.3 งานวิจัยของพืชสกุล *Curcuma* ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ

ในปี 2013 Chen และคณะ (34) ได้รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านมะเร็งของน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง (*C. zedoaria*) ในการต่อต้าน non-small cell lung carcinoma cells ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* ซึ่งทำการนำผงจากเหง้าของว่านเหลียง มาทำการกลั่นด้วยน้ำ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง มีฤทธิ์เป็นพิษต่อ non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของเซลล์ (cell apoptosis) อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง เพิ่ม sub-G1 population และระดับของการจับ annexin-V และเหนี่ยวนำการ cleavage และการกระตุ้นของ caspase-3, -8, -9 และ poly (ADP ribose) และเมื่อสังเกตหลังการรักษาด้วยน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง พบว่ามีการลดลงของระดับ Bcl-2 และ Bcl-xL และการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วน Bax / Bcl-2 เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียงนั้น จะนำไปสู่การปลดปล่อย AIF, endonuclease G และ cytochrome c เข้าไปใน cytosol และเพิ่มระดับ p53 ในเซลล์ H1299 และจากผลการวิจัยของเราพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียงเล็กน้อย สามารถ phosphorylation ของ ERK1/2 และเพิ่ม phosphorylation of JNK1/2 และ p38 อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง ยับยั้งเส้นทางการส่งสัญญาณ AKT / NF- κ B ในเซลล์ H1299 อย่างไรก็ตามการบริหารน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง ทางในช่องท้อง สามารถยับยั้งหรือลดการเจริญเติบโตของเซลล์ H1299 ในร่างกาย (*in-vivo*) ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังตรวจพบสารประกอบที่มีฤทธิ์ โดยใช้ gas chromatography และ mass spectrometry สารประกอบที่มีฤทธิ์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากว่านเหลียง

มีดังนี้ 8,9-Dehydro-9-formyl-cycloisolongifolene, 6-ethenyl-4,5,6,7-tetrahydro-3,6-dimethyl-5-isopropenyl-trans-benzofuran, eucalyptol และ γ -elemene

ในปี 2014 Hamdi และคณะ (35) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ cytotoxic ของว่านเหลียง (*C. zedoaria*) ที่สกัดด้วยเฮกเซน และเมทานอลในเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของมนุษย์โดยใช้วิธี MTT Cytotoxicity ในการทดสอบ พบว่าสาร curcumenone และ curcumenol ที่อยู่ในสารสกัดเฮกเซนนั้นมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis โดยการยับยั้งการกระจายตัวของเซลล์มะเร็ง อีกทั้งพบความเป็นพิษที่ต่ำในการทดสอบกับเซลล์ปกติ

ในปี 2010 Su และคณะ (36) ได้ทำการเสริมความจำในหญิงวัยหลังหมดประจำเดือน โดยการให้สารสกัดว่านชักมดลูก (*C. comosa*) ที่สกัดด้วยเฮกเซนในหนู Wistar rats โดยให้ขนาด 250 หรือ 500 mg/kg มี 17-estradiol เป็น positive control หลังจากให้สารสกัดเป็นเวลา 30 วันแล้วนำหนูไปทำการทดสอบ Morris water maze เพื่อทดสอบความจำโดยจะทำซ้ำทุก 30 วันรวมทั้งหมดเป็นเวลา 119 วัน พบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกสามารถจำตำแหน่งแท่นย่นได้หลังจากผ่านไป 67 วันซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าฤทธิ์ในการเสริมความจำนั้นจะสูงขึ้นตามขนาดที่ให้อีกด้วย

ในปี 2007 Sodsai และคณะ (37) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าของว่านชักมดลูก (*C. comosa*) ด้วยเฮกเซนและเอทานอลต่อฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบพบว่า สาร 1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol และสาร 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol มีผลลดการหลั่ง tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ interleukin 1 β ซึ่งเป็นสารก่อกระบวนการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) จากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือด peripheral blood mononuclear cell และเซลล์เพาะเลี้ยง human pro-monocytic U 937 ที่ก่อให้เกิดการอักเสบด้วยสาร phorbol-12-myristate-13-acetate และยังพบอีกว่า สารสกัดชั้นเฮกเซนและสารกลุ่มไดเอริลเฮปตานอยด์ แสดงฤทธิ์ป้องกันตับของหนูทดลองจากการกระตุ้นให้อักเสบด้วย carbon tetrachloride (38)

ในปี 2011 Jariyawat และคณะ (39) ได้ทำการศึกษาสารไดเอริลเฮปตานอยด์ 5 ชนิดที่แยกได้จากเหง้าว่านชักมดลูก (*C. comosa*) พบว่าสาร 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol ในกลุ่มไดเอริลเฮปตานอยด์ มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P-388 leukemia เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยการทำให้พันธะของ DNA แตกออกทำให้เพิ่มกิจกรรมยับยั้งการแบ่งเซลล์ขึ้น

2.5 การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังเคลขมิบบาง (Thin Layer Chromatography fingerprint) (40)

Chromatographic fingerprints เป็นวิธีการทดสอบที่สามารถทดสอบสารสำคัญ ได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่กำหนดในตำรายาสมุนไพร (Herbal Pharmacopoeia) โดย chromatographic fingerprints สามารถใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางโครมาโทกราฟีได้หลากหลายวิธี ได้แก่ โครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง (thin-layer chromatography; TLC) โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography; HPLC) และโครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส (gas chromatography; GC) เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน จะเป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่าย ราคาถูก สามารถเลือกวิธีการตรวจสอบผลได้หลากหลาย และเป็นเทคนิคที่นิยมในตำรายาสมุนไพร โดย chromatographic fingerprints เป็นการทดสอบที่อาศัยเทคนิคการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้แยกออกจากกัน เป็นส่วนๆ และจะได้ผลของการแยกสาร ที่เรียกว่า chromatogram ต่อจากนั้นจึงนำผล chromatogram ของสารสกัดหยาบ ที่ได้จากสมุนไพรตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับ chromatogram ของสารมาตรฐาน

การใช้ chromatographic fingerprints ในการทดสอบสมุนไพรนั้น มีสาเหตุมาจากสมุนไพรชนิดเดียวกันนั้น สามารถเจริญเติบโตได้หลากหลายพื้นที่ อีกทั้งการที่ช่วงเวลาเก็บสมุนไพร สภาพภูมิอากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน ทำให้ปริมาณและชนิดของสารสำคัญไม่เหมือนกันหรือไม่เท่ากันแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันก็ตาม ดังนั้นการใช้ chromatographic fingerprints ในการทดสอบสมุนไพร จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร และเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้ในครั้งเดียวกัน อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในสมุนไพร การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว พื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะปลูก วิธีการ สกัดและการเก็บรักษาที่ดีอีกด้วย

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ (41) รายงานการทดสอบ TLC ของสารสกัด 80% เอทานอลใช้ว่านเหลือง (*Curcuma sp.*) ที่ได้จากจังหวัดอุบลราชธานี เชียงราย ราชบุรี และสุพรรณบุรีและว่านชั้กมดลูก (*C. comosa*) ที่ได้จากจังหวัดปราจีนบุรี และทำการทดสอบโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ในว่านเหลืองเป็น n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 ส่วนว่านชั้กมดลูกเป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 จากนั้นทำการสังเกตตำแหน่งของแถบต่าง ๆ ภายใต้ UV 254 และ 365 nm และนำแผ่น TLC มาพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid และสังเกตสีของแถบที่เกิดขึ้น

และคำนวณค่า R_f ซึ่งผลที่ได้ พบว่า ตัวอย่างของว่านเหลืองทุกแหล่งประกอบไปด้วยแถบสาร 4 แถบ ซึ่งมีสารหลัก 3 แถบ ($R_f = 28, 34, 83$) เป็นสารกลุ่ม curcuminoids ที่ให้ผล quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm แต่ไม่เรืองแสงเมื่อตรวจสอบด้วย UV 365 nm และให้แถบสีม่วงเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid และอีก 1 แถบสารเป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ส่วนแถบสารที่มีค่า $R_f = 28$ คือ สาร *ar-tumerone* ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับสารเปรียบเทียบกับ *ar-tumerone* ที่ให้ผล quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm และให้แถบสีม่วงเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid ส่วนผลของตัวอย่างว่านขี้มดลูกนั้น ประกอบไปด้วยแถบสารที่ให้ผล quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm และให้ผลบวกเป็นแถบสีม่วง ม่วงแดง ม่วงน้ำเงินเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid

Thai Herbal Pharmacopoeia 2019 (42) ได้ระบุการทำ TLC ของว่านเหลือง (*Curcuma* spp.) โดยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ toluene: chloroform: absolute ethanol (49:49:2) เมื่อทำการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารภายใต้แสง UV 366 nm พบว่าจะพบแถบสารทั้งหมด 51 แถบ และเมื่อทำการสเปรย์น้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid ซึ่งใช้ในการทดสอบสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ อนุพันธ์ของฟีนิลโพรเพน และฟีนอล (87) และทำการสังเกตด้วยตาเปล่า พบแถบสารทั้งหมด 78 สาร

2.6 สารพฤกษเคมี (43,44)

สารเคมีชนิดต่างๆที่พบในพืช ซึ่งจะพบสารเป็นจำนวนมากสามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (biosynthetic origin) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งสารปฐมภูมิ เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบได้ในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและกระบวนการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช ซึ่งพบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้มักจะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน ดังนี้

- 1) อัลคาลอยด์ เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ที่พบได้มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล มีไนโตรเจนอยู่ในโครงสร้างเป็นองค์ประกอบหลักทำให้มีคุณสมบัติเป็นด่าง รสขม และไม่ละลายน้ำ มีคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย อัลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ แก้อหวน้ำคั่ง ยารักษาแผลในกระเพาะและ ลำไส้ ยาลดความดัน ยาตา ตลอดจนยาที่ควบคุมการเต้นของหัวใจ
- 2) ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบประเภท polyphenolics compound มักพบเป็นเม็ดสีอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ให้สีส้มของดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้หลายชนิด มีคุณสมบัติละลายน้ำ โดยในธรรมชาติสามารถพบฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปอิสระหรือในรูปไกลโคไซด์ ที่เรียกว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส และฟลาโวนอยด์บางชนิดยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย
- 3) แอนทราควิโนน เป็นสารกลุ่มควิโนนที่มีความสำคัญและพบได้มากที่สุด สามารถพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ แอนทราควิโนนมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3-ring system ซึ่งมีสีแดง ส้ม เหลือง หรือน้ำตาล ส่วนอะไกลโคนของแอนทราควิโนนนั้นละลายได้ดีในต่างให้สีชมพู-แดง แอนทราควิโนนมีการนำมาใช้เป็นยาระบายและยาถ่ายกันอย่างกว้างขวาง
- 4) คูมาริน เป็นแลคโตนของ o-hydroxy cinamic acid เป็นสารที่สามารถพบได้ทั้งในธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ขึ้นมาโดยจะพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ คูมารินเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะมีออกซิเจนที่ตำแหน่ง C-7 ซึ่งอาจพบได้ในรูปของ hydroxyl

หรือ alkoxy สารในกลุ่มคูมารินสามารถดูดกลืนแสง UV ได้ในช่วงคลื่นที่กว้างให้การเรืองแสงสีฟ้า สีเขียวอมเหลืองถึงเหลืองและม่วง แล้วแต่ชนิดของคูมาริน คูมารินที่มีกลุ่ม OH อีสาระอยู่บนวงเบนซีนจะมีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ในตัวเองแต่สำหรับสารที่ไม่มี OH อีสาระอยู่บนวงเบนซีน เช่น คูมารินจะไม่เรืองแสง จะต้องนำมาทดสอบด้วยต่างเพื่อให้ง่ายแลคโตนแตกออก แล้วจึงส่องด้วย UV เพื่อเปลี่ยนจาก cis-form ให้เป็น trans-form จึงจะเกิดเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง โดยจะเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อมีแอมโมเนียอยู่ คูมารินนั้นมีการนำมาใช้เป็นยาบำรุงเลือด ขยายหลอดเลือดหัวใจ และป้องกันการแข็งตัวของเกล็ดเลือด

- 5) แทนนิน เป็นสารประกอบประเภทฟีนอลิกที่พบได้มากในพืชหลายชนิด มีโครงสร้างที่ใหญ่และค่อนข้างซับซ้อน มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนและมีรสฝาด สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบจำพวกโปรตีนทำให้ตกตะกอนได้ แทนนินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยในเรื่องของการฝาดสมาน แก้ท้องเสีย
- 6) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อหัวใจโดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ผลในการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของอะไกลโคโคน และชนิดของน้ำตาลคาร์ดิแอกไกลโคไซด์นั้นมีการใช้ในการรักษาโรคหัวใจวาย
- 7) ซาโปนิน เป็นไกลโคไซด์ที่มีส่วนอะไกลโคโคน (sapogenin) เป็นสารจำพวกสเตียรอยด์ หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ส่วนนี้จะกับส่วนน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C3 ได้เป็น O-glycoside ซาโปนินมีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยในการฝาดสมาน และลดแรงตึงผิว

2.6.1 การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบพิษของเคมีในพืชวิจัย

ในปี 2017 ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และคณะ (45) ได้ทำการทำการแยกสารจากสารสกัดของเหง้าว่านชักมดลูก (*C. comosa*) ขึ้นเฮกเซน คลอโรฟอร์มและเอธิลอะซีเตต เมทานอล พบว่ามีสารกลุ่มไดแอริลเฮปตานอยด์ โมโนเทอร์ปีน และเซสควิเทอร์ปีน นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มไดเทอร์ปีนได้มาจากการสกัดและแยกสารขึ้นเฮกเซนจากส่วนเหนือดิน และพบสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดเหง้าขึ้นเอธิลอะซีเตตและเมทานอล

ในปี 2003 Himaja และคณะ (46) ได้ทำการค้นคว้าข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับสารพิษเคมีในขมิ้นชัน (*C. longa*) พบว่ามีสารประกอบกว่า 235 ชนิดที่เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก โมโนเทอร์ปีน เซสควิเทอร์ปีน ไดเทอร์

ปิ่น ไตรเทอร์ปีน ไดแอริลเฮปตานอยด์ ไดแอริลเพนตานอยด์ สารกลุ่มสเตียรอยด์และอัลคาลอยด์ รวมถึงเคอร์คูมินและเคอร์คูมินอยด์ที่ให้สีเหลืองในขมิ้นชันและพืชมงคล Zingiberaceae อื่น ๆ

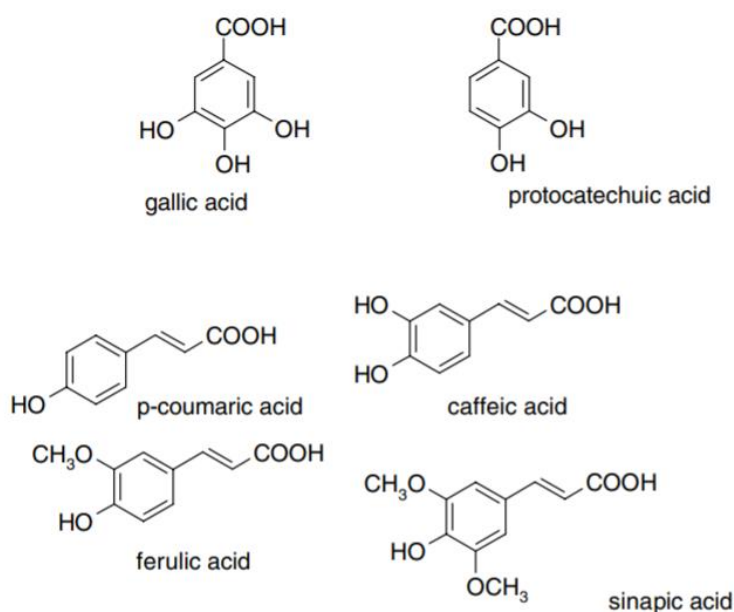
ในปี 2014 Golam และคณะ (47) ได้ทำการศึกษาสารฟลาโวนอยด์เบื้องต้นในสารสกัดเอทานอลจากเหง้าของว่านเหลียง (*C. zedoaria*) พบสารกลุ่ม แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน อัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ คาร์โบไฮเดรต และสเตียรอยด์

ในปี 2019 Chiu และคณะ (48) ได้ทำการสกัดเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลและทำการตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี HPLC พบว่าอาจจะมีสารกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และเทอร์พีนอยด์

2.7 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

2.7.1 สารประกอบฟีนอลิก (49)

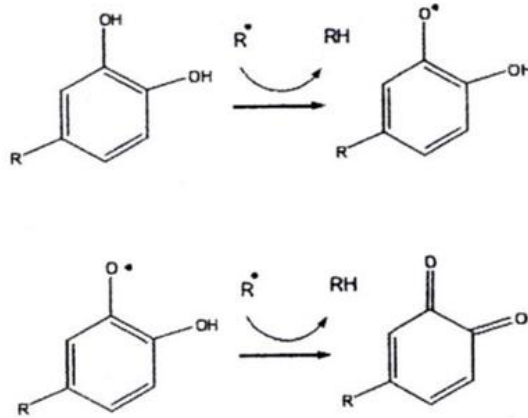
สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอลมีโมโนไฮดรอกซี ซึ่งสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ สารประกอบฟีนอลิกมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วงและหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 : โครงสร้างโมเลกุลของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (50)

1) กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) โดยเมื่อมีอนุมูลอิสระมาติดอิเล็กตรอนแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่น ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรและไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (51) แสดงดังภาพที่ 6 โดยที่ R คืออนุมูลอิสระ



ภาพที่ 6 : การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลิก (52)

2) การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบสารประกอบฟีนอลิกในพืชวิจัย

ในปี 2012 Samarasinghe และคณะ (53) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดเมทานอลของพืชตระกูล *Curcuma* รวมถึง *C. zedoaria* พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 1.687 ± 0.001 และ 2.164 ± 0.001 g of GAE/ 1 g น้ำหนักผงแห้ง ในสารสกัดส่วนเหง้าและส่วนใบตามลำดับ

ในปี 2019 Akter และคณะ (54) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดเมทานอลของ *C. zedoaria* โดยอ้างอิงวิธีการทดลองมาจาก Kahkonen และคณะ (1999) พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 43.7 ± 0.9 mg GAE/g extract

ในปี 2020 Burapan และคณะ (55) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ชีวเคมีในสารสกัดเมทานอลของพืชสกุล *Curcuma* ที่พบได้ในประเทศไทยด้วยวิธี Folin–Ciocalteu โดยทำการทดลองใน 96 well plate และตรวจวัดที่ 765 nm พบว่า *C. comosa* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 3.9 ± 0.4 mg GAE/g น้ำหนักผงแห้ง

2.7.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก โดยเฉพาะการเป็น free radical scavenger สารในกลุ่มนี้มักพบในผัก และผลไม้ มีรายงานถึงความสามารถในการปกป้อง DNA จาก hydroxyl radical ได้ (56) และเป็นสารเมแทบอลิต์ชั้นทุติยภูมิในพืช สร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ ฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน และมาโลเนต โดยทำหน้าที่เป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช ช่วยในการกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ต และการช่วยตรึงไนโตรเจน (57) นอกจากนี้ สารประกอบฟลาโวนอยด์ยังมีความสำคัญต่อการสร้างรงควัตถุในพืช ทำหน้าที่เป็นไฟโตอเล็กซินเพื่อช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยป้องกันแสงอุลตราไวโอเล็ต ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีฤทธิ์ในการช่วยต้านอนุมูลอิสระ (58)

1) กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางหรือหยุดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free radical chain terminator) ตัวจับออกซิเจน (oxygen scavenger) หรือเป็น chelating agent ของโลหะ เป็นต้น

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ จะทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลให้กับออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นการรับประทานอาหารประเภทผักและผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ จะสามารถช่วยปกป้องจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้

2) การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ในพืชวิจัย

ในปี 2019 Akter และคณะ (59) ได้ทำการศึกษหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดเมทานอลของ *C. zedoaria* โดยอ้างอิงวิธีการทดลองมาจาก Kahkonen และคณะ (1999) พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 15.3 ± 0.8 mg Rutin/g extract

ในปี 2020 Tuy-on และคณะ (60) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ *In Vitro* cytotoxicity activity และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในพืชสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศไทยรวมถึง *C. comosa* โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชจากจังหวัดเพชรบุรีเมื่อปี 2018 และทำการสกัดด้วย 95% เอทานอล พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 139.28 ± 3.04 mg QE/g

2.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

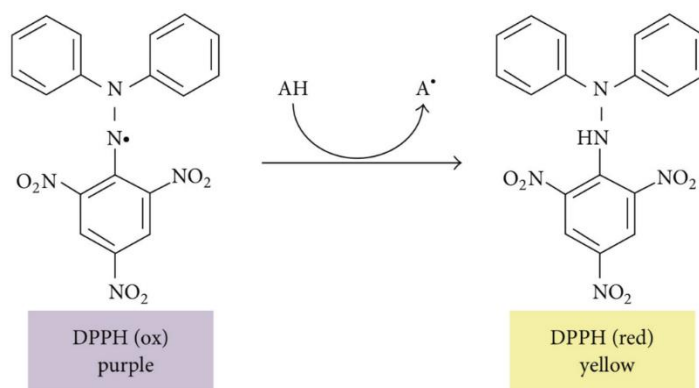
2.8.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (61,62)

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) มีสถานะเป็นอนุมูลอิสระ (DPPH[•]) ที่มีความคงตัวโดยสภาพธรรมชาติ เป็นสารที่นิยมใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) โดยเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายใน absolute ethanol จะมีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm และเมื่อได้รับ H จากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอนุมูลอิสระ DPPH[•] ไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) จะสังเกตได้จากสารละลายที่มีสีจางลง จากสีม่วงจนเป็นสีเหลือง แสดงดังภาพที่ 7 ซึ่งทำให้หาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร ได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 515 nm เป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หรือก็คือการลดลงของ DPPH ที่มีผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระ

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้คืออนุมูลอิสระ DPPH[•] มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย จึงเกิดปฏิกิริยาได้ช้า ซึ่งทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้ น้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงได้ และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างเป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้

IC₅₀ คือ ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50% ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50%



ภาพที่ 7 : กลไกการเกิดปฏิกิริยา DPPH radical scavenging (63)

2.8.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (61,62)

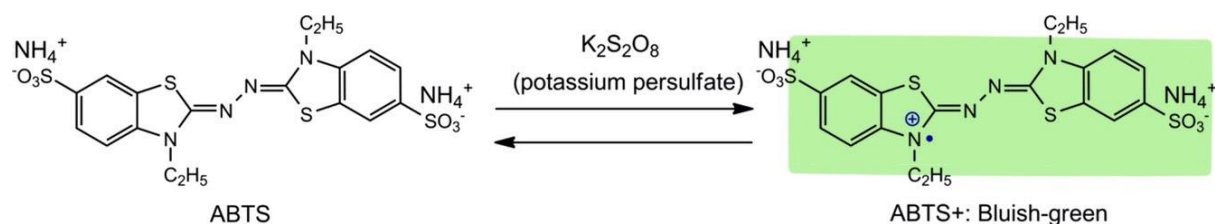
ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) มีหลักการเหมือนกับการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH แต่ในกรณี $ABTS^{\cdot+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นบวก ในสารละลายจะมีสีเขียวปนน้ำเงิน ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) หลายค่าอันได้แก่ 415, 645, 734 และ 815 nm แต่ทั่วไปจะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ในการเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวกของ $ABTS^{\cdot+}$ เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีหลายวิธี ดังนี้

1. ใช้ enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด $ABTS^{\cdot+}$ เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น
2. ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium persulfate, 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) เป็นต้น

แต่วิธีที่นิยมนั้น คือ การใช้สารเคมี ดังนั้นการเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS จึงต้องนำ ABTS มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ด้วยอัตราส่วน 1:0.5 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้อนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวกของ $ABTS^{\cdot+}$ จากนั้นจะปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{\cdot+}$ ให้เป็น 0.700 ± 0.02 และเมื่อเติมสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร จะทำให้ $ABTS^{\cdot+}$ ลดลง สังเกตได้จากสีของสารละลายจางลง แสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งทำให้หาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร ได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 734 nm เป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox ทำเช่นเดียวกันกับวิธี DPPH

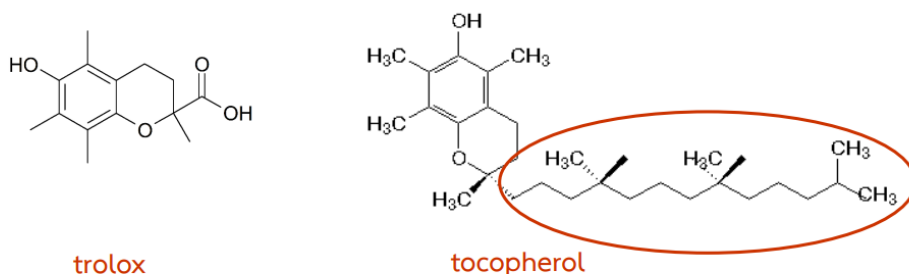
ข้อดีของวิธีการนี้คือ $ABTS^{\cdot+}$ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง

ข้อเสียคือ $ABTS^{\cdot+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 8 : กลไกการเกิดปฏิกิริยา ABTS radical scavenging (64)

trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนแปลงสายอัลเคนให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก แสดงดังภาพที่ 9 ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น จึงทำให้ออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี ซึ่งในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน



ภาพที่ 9 : โครงสร้างสารมาตรฐาน trolox (65)

2.8.3 การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

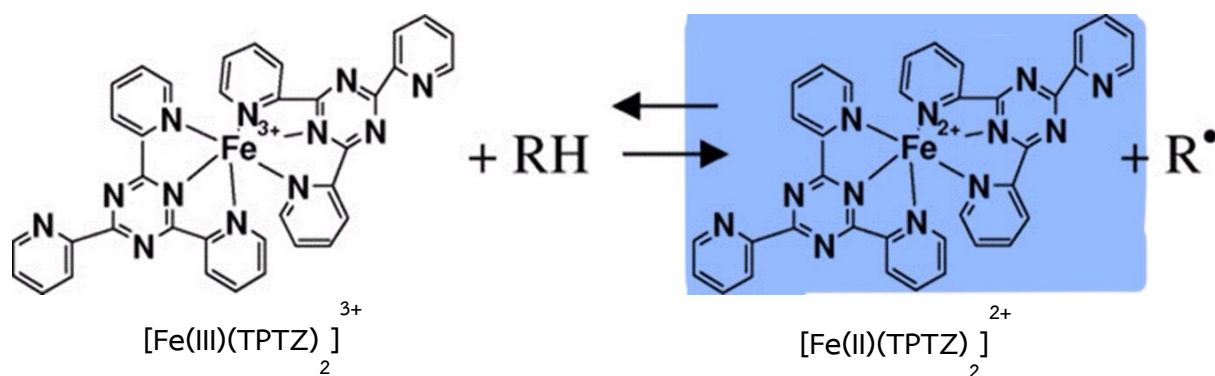
(61,62)

วิธีนี้มีหลักการ คือการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ (คุณสมบัติเป็น reductant ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method) ซึ่งจะแตกต่างจากวิธีการที่กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยในสารละลาย FRAP ประกอบด้วย Fe^{3+} และ 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ)

ในสภาวะที่เป็นกรด โดยสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ (Ferric tripyridyltriazine) จะรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน หรือสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร แล้วเปลี่ยนแปลงได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ (Ferrous tripyridyltriazine) ซึ่งจะสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงินที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้จะวัดจากการเพิ่มขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นนี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น แสดงดังภาพที่ 10

ข้อดีของวิธีการนี้คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพงและสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม

ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกายและสารละลายที่ใช้ อาจต้องใช้ น้ำปราศจากไอออน (deionized water)



ภาพที่ 10 : กลไกการเกิดปฏิกิริยา FRAP radical scavenging (66)

2.9 การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (67)

เอนไซม์ (enzyme) เป็นกลุ่มของโปรตีน มีหน้าที่แตกต่างไปจากโปรตีนอื่นๆ ทั่วไป หรือกล่าวคือ มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยเอนไซม์นั้น จะมีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า “สับสเตรต” (substrate) และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ โดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้

สารอะเซทิลโคลีนเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบประสาท cholinergic ถ้าหากปริมาณสารชนิดนี้ลดลงหรือไม่เพียงพอ จะทำให้ส่งผลต่อระบบประสาท cholinergic รวมทั้ง ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อมได้ สารอะเซทิลโคลีน (ACh) สร้างมาจาก acetyl coenzyme A (acetyl CoA) และ choline โดยเอนไซม์โคลีน อะเซทิลทรานเฟอเรส (CAT) และถูกกักเก็บไว้ใน vesicle ของ presynaptic neurons เมื่อเซลล์ประสาทชนิดนี้ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการปลดปล่อยอะเซทิลโคลีนออกมาโดยกระบวนการ exocytosis สารอะเซทิลโคลีนจะไปจับกับ postsynaptic receptor ซึ่งอาจจะเป็น muscarinic หรือ nicotinic receptor จากนั้นอะเซทิลโคลีนจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ได้ choline และ acetate จากนั้น choline จะถูก uptake กลับเข้าสู่ presynaptic terminal เพื่อนำไปสร้างอะเซทิลโคลีนใหม่ อะเซทิลโคลีนมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเรียนรู้และจดจำ ดังนั้นการรักษาที่เกี่ยวกับระบบประสาท cholinergic อาจทำได้ โดยการเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นเพื่อใช้ในการสร้างอะเซทิลโคลีนด้านการทำงานของ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเพื่อลดการทำลายอะเซทิลโคลีน และเพิ่มปริมาณ muscarinic receptor เพื่อเพิ่มการส่งสัญญาณประสาทต่อไป (81)

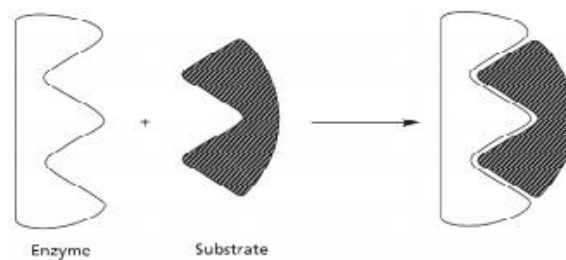
2.9.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ (68)

การจับตัวระหว่างสับสเตรตกับเอนไซม์ เอนไซม์ประกอบไปด้วยบริเวณเร่งหรือเรียกว่า *active site* ซึ่งเกิดจากการม้วนพับตัวของสายพอลิเพปไทด์ หากเทียบขนาดของบริเวณส่วนนี้กับทั้งโมเลกุลของเอนไซม์แล้ว พบว่า *active site* มีขนาดเล็กมากและมักมีลักษณะเป็นร่อง (cleft) เว้าลึกลงไปจากพื้นผิวของเอนไซม์ ซึ่งเหมือนกับเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะสำหรับการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ทำงานได้ดีมากน้อยเพียงใดขึ้นกับความสามารถที่ตำแหน่ง *active site* นี้ การจับกับสับสเตรตและเกิดเป็นสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรต (enzyme-substrate complex) โดยที่พันธะทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตอาจเป็นได้ทั้งโคเวเลนต์ พันธะไฮโดรเจน หรือแรงแวนเดอร์วาลส์

ความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์สามารถอธิบายด้วยทฤษฎีดังต่อไปนี้ (69)

1. ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (The lock and key theory) โครงสร้างการเกิดการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรต จะเป็นโครงสร้างที่ไม่ยืดหยุ่น โดยที่โมเลกุลของเอนไซม์จะมีโครงสร้างส่วนหนึ่งที่จะสามารถรวมกับสับสเตรตได้พอดีเหมือนกับการที่ลูกกุญแจสวมเข้าพอดีกับแม่กุญแจ ทำให้สับสเตรตเปลี่ยนไปและกลายเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งส่วนนั้นเรียกว่า *active site* และเป็นส่วนที่ไม่ยืดหยุ่น อีกทั้งมีความเฉพาะเจาะจงต่อสับสเตรต จึงเป็นการยากที่จะอธิบายถึงการเกิดปฏิกิริยาผันกลับ (reversibility) เนื่องจากผลิตภัณฑ์จะไม่สามารถรวมกับ *active site* ของเอนไซม์ได้ เพราะโครงสร้างต่างจากสับสเตรต แสดงดังภาพที่

11



ภาพที่ 11 : แสดงถึงความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ที่อธิบายได้ด้วยทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (70)

2. ทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (induced-fit theory) นำเสนอโดย Koshland อธิบายว่า เมื่อสับสเตรตเข้ามาจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ หรือเรียกว่า *active site* นั้น จะสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงสร้างได้ เมื่ออยู่ใกล้กับสับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ เพื่อจะได้รวมกับสับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ได้ ทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ดีขึ้นและเกิดปฏิกิริยาได้ผลผลิต นอกจากนี้สารที่ไม่ใช่สับสเตรต แต่มีลักษณะคล้ายสับสเตรตก็สามารถที่จะเข้าจับที่ *active site* ของเอนไซม์ได้ แต่ไม่สามารถชัก

นำเอนไซม์เปลี่ยนโครงสร้างที่เหมาะสมได้ ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาได้ผลผลิต และในทฤษฎีนี้สามารถอธิบายได้กว้างกว่าทฤษฎีแรก เพราะแสดงถึงความยืดหยุ่นและลักษณะไม่แข็งของเอนไซม์บางชนิดที่ *active site*

2.9.2 ตัวยับยั้งเอนไซม์ (69)

ตัวยับยั้งเอนไซม์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) ตัวยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor) จะเป็นตัวยับยั้งที่มีการทำงานเป็นการทำลายหรือการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน 1 หมู่หรือมากกว่าตามเท่าที่จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และตัวยับยั้งเอนไซม์แบบนี้จะสามารถจับกับเอนไซม์อย่างแน่นทั้งแบบ non covalent bond และ covalent bond ได้

2) ตัวยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด

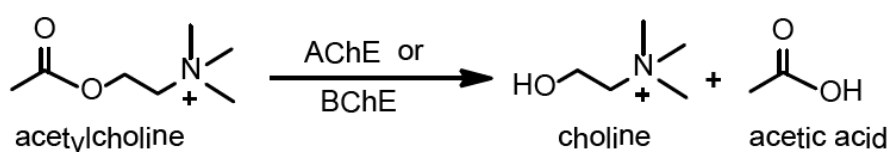
(1) ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) จะเป็นตัวยับยั้งที่เป็นสารที่สามารถเข้าไปแย่งจับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรต แล้วทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นลดลง

(2) ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibitor) หรือตัวยับยั้งแบบผสม (mixed inhibitor) โดยตัวยับยั้งชนิดนี้จะมีการเข้าไปจับที่บริเวณอื่นๆ บนโมเลกุลของเอนไซม์ที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้บริเวณเร่งนั้นเปลี่ยนไป จึงทำให้ไม่สามารถทำงานได้

3) การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibition) คือ เกิดการยับยั้งขึ้นเมื่อตัวยับยั้งเอนไซม์เข้ารวมเฉพาะกับเอนไซม์สับสเตรตคอมเพลกซ์เท่านั้นแบบไม่ผันกลับ และจะเกิดเป็น ESI complex ซึ่งจะทำให้ไม่ได้ผลผลิตเกิดขึ้น การยับยั้งแบบนี้จะมีลักษณะเหมือนกับการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน โดยไม่เกิดการผันกลับ (reversible) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรต

2.9.3 เอนไซม์ยับยั้งอื่นๆนอกเหนือจากฤทธิ์การยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (71)

การลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนเกิดจากเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส 2 ชนิดคือ อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และบิวทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสพบได้ที่สมอง และส่วนบิวทิลโคลีนเอสเตอเรสพบที่พลาสมาและตามอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ และลำไส้ เป็นต้น เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดทำหน้าที่สลายอะเซทิลโคลีน (hydrolyze acetylcholine) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น choline แสดงดังภาพที่ 12 และ acetic acid ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และบิวทิลโคลีนเอสเตอเรสต่างกันคือ 65:35 หรือ 2:1 ดังนั้นยาที่ดีควรยับยั้งเอนไซม์ได้ทั้ง 2 ชนิด



ภาพที่ 12 : แสดงการสลาย acetylcholine ด้วยเอนไซม์ AChE หรือ BChE

แนวทางการออกแบบสารที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสใหม่ สำหรับใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในช่วง 10 ปีมานี้ นอกเหนือจากความพยายามในการออกแบบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงขึ้นแล้ว ยังมีแนวคิดในการออกแบบสารซึ่งในหนึ่งโมเลกุลมีฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรคหรืออาการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรค เช่น ฤทธิ์ Monooxidase inhibitor (MAOI), Serotonin transporter (SERT) inhibitors, Calcium channel blockers, NO-donor, NMDA receptor antagonists, BACE1 inhibitor เป็นต้น สารที่มีแบบแผนในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างในโมเลกุลเดียวเหล่านี้ เรียกว่า Multi-target-directed ligands (MTDLs) โดยแนวทางการออกแบบ MTDL ได้แก่ การเชื่อมต่อระหว่างสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส กับสารที่มีฤทธิ์ด้านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของการเกิดโรค หรือการทำอนุพันธ์ลูกผสม (hybrid molecule) โดยอนุพันธ์ลูกผสม หมายถึง สารที่ได้จากการนำ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมารวมกันเป็นโมเลกุลใหม่ โดยมุ่งหวังให้สารใหม่ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกับสารต้นแบบ

2.9.4 การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

1) Colorimetric assay (73)

เป็นการทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาของ Ag⁺ ion-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ที่เข้าจับกับ tricholine ที่หลุดออกมาจากเอนไซม์อะเซทิลโคลีนหลังจากถูกทำลายโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในการทดสอบฤทธิ์ โดยมีหลักการการว่าเมื่อ Ag⁺ ion จับกับ tricholine จะเกิดการออกซิไดซ์ขึ้นทำให้สารละลายจางลงจากสีฟ้าเป็นใสไม่มีสี ซึ่งแสดงถึงปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนที่ถูกทำลายไป แสดงดังภาพที่

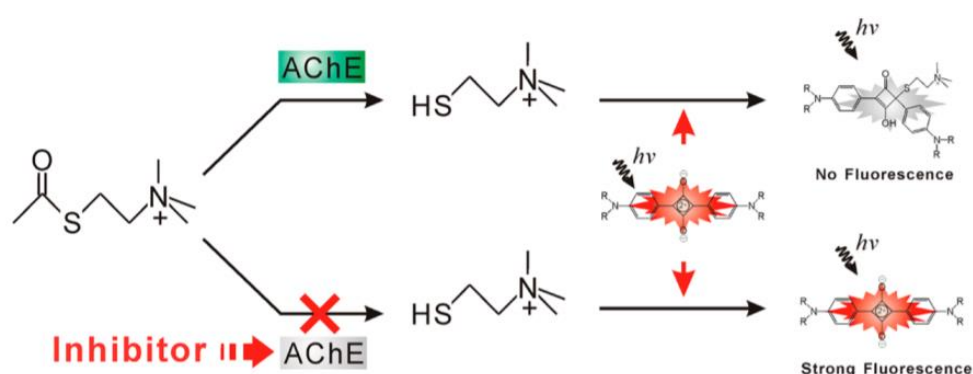
13



ภาพที่ 13 : การจางลงของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิไดซ์ระหว่าง Ag⁺ ion กับ tricholine (74)

2) Fluorometric's assay (75)

ใช้หลักการเรืองแสง fluorescence ของอนุพันธ์ squaraine ซึ่งโดยปกติมันจะไม่เกิดการเรืองแสง หากเข้าจับกับโครงสร้างที่มีหมู่ thiol ซึ่งในที่นี้ก็คือไตรโคลีนที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ดังนั้นถ้าหากว่าสารที่ต้องการทดสอบสามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ และไม่เกิดเป็นไตรโคลีนขึ้นมาอนุพันธ์ squaraine ก็จะไม่เกิดการเรืองแสงขึ้น ยิ่งสารที่ต้องการทดสอบนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มากเท่าไรก็จะยิ่งเกิดการเรืองแสงมากขึ้นเท่านั้น แสดงดังภาพที่ 14 ข้อดีของวิธีการนี้ คือ มีความแม่นยำสูงแม้ใช้สารที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่ำ อีกทั้งตรวจวัดผลง่าย

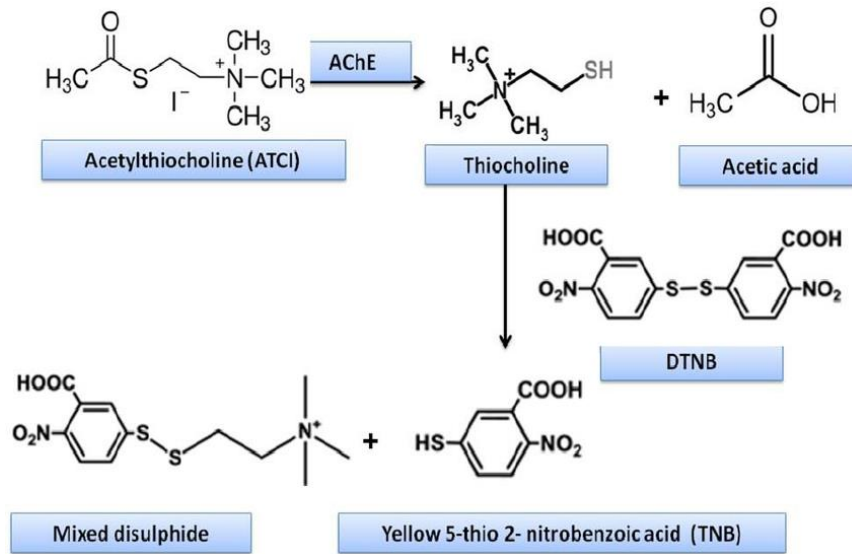


ภาพที่ 14 : แสดงการเรืองแสงของ squaraine ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (76)

3) Ellman's method (77)

ใช้ตรวจวัดการถูกทำลายของเอนไซม์อะเซทิลโคลีน โดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งจะได้ออกมาเป็น thiocholine และ acetic acid ซึ่ง thiocholine จะเข้าทำปฏิกิริยากับ DTNB และเกิดปฏิกิริยาเกิดเป็นสารประกอบสีเหลือง แสดงดังภาพที่ 15

ข้อดีของวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ข้อเสียคืออาจเกิด false positive reaction จากหมู่ oxime ที่เรียกกันว่า oximolysis ได้



ภาพที่ 15 : กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง thiocholine และ DTNB ในการทดสอบวิธี Ellman's method (78)

จากการศึกษาทบทวนวรรณกรรมแล้วผู้วิจัยเห็นว่าพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง รวมถึงยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของวุ้นเหืองและวุ้นชัมดลูกเอง ก็มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ผู้วิจัยจึงได้มีความสนใจที่จะนำพืชทั้งสองชนิดนี้มา ทำการศึกษาวิจัยต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างสมุนไพร

ทำการกำหนดตัวอย่างสมุนไพรที่ต้องการนำมาศึกษา ค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเก็บรักษาตัวอย่างสมุนไพร การเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการอัดตัวอย่างพรรณไม้แห้งเพื่อส่งตรวจสอบระบุชนิดและเป็นตัวอย่างอ้างอิง บันทึกข้อมูลสถานที่ วันและเวลาที่จัดเก็บตัวอย่างสมุนไพรดังแสดงในตารางที่ 3 และทำการจัดเก็บตัวอย่างสดแสดงดังภาพที่ 16 และนำส่วนเหง้าไปใช้ในการทำวิจัย จากนั้นนำตัวอย่างสมุนไพรที่เก็บตัวอย่างมาทำพรรณไม้แห้ง หรือ herbarium และส่งตัวอย่างสมุนไพรเพื่อทำการตรวจสอบและระบุชนิด ณ สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร



ภาพที่ 16 : ลักษณะต้นของว่านเหลือง
(ด้านซ้าย) และว่านชั้กมดลูก (ด้านขวา)

ตารางที่ 3 : ข้อมูลการเก็บตัวอย่างว่านเหลืองและว่านชักมดลูก

ลำดับที่	พืช	ส่วนที่เก็บ	สถานที่เก็บ	ช่วงที่เก็บ
1	<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe. (ว่านเหลือง)	เหง้า 6.63 kg	ตำบล คลองขุด อำเภอ ท่า ใหม่ จังหวัด จันทบุรี	พฤษภาคม 2563
2	<i>Curcuma comosa</i> Roxb. (ว่านชักมดลูก)	เหง้า 2.28 kg	ตำบล คลองขุด อำเภอ ท่า ใหม่ จังหวัด จันทบุรี	พฤษภาคม 2563

3.2 การเตรียมสารสกัด

ในขั้นตอนก่อนทำการสกัดพืช จะทำการล้างทำความสะอาดส่วนเหง้าของพืชและหั่นเป็นแว่น แสดงดังภาพที่ 17-18 ก่อนที่จะนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วันหรือจนกว่าพืชจะแห้งได้ เป็นลักษณะแสดงดังภาพที่ 19-20 แล้วจึงนำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่อง Hammer mill แสดงดังภาพที่ 21-22 ก่อนจะนำไปทำการสกัดด้วยวิธี percolation และ Soxhlet เป็นลำดับถัดไป



ภาพที่ 17 : ส่วนเหง้าสดของว่านชักมดลูก



ภาพที่ 18 : ส่วนเหง้าสดของว่านเหลือง



ภาพที่ 19 : ส่วนเหง้าที่หั่นแว่นและตาก
แห้งแล้วของว่านชักมดลูก



ภาพที่ 20 : ส่วนเหง้าที่หั่นแว่นและตาก
แห้งแล้วของว่านเหลียง



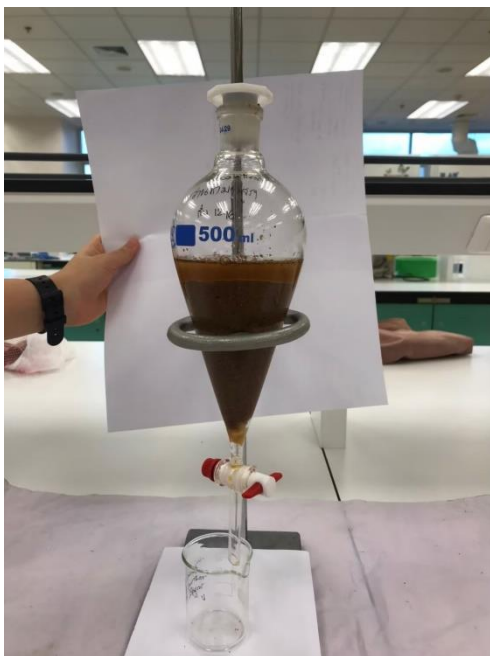
ภาพที่ 21 : ลักษณะผงของว่านชัก
มดลูกก่อนทำการสกัด



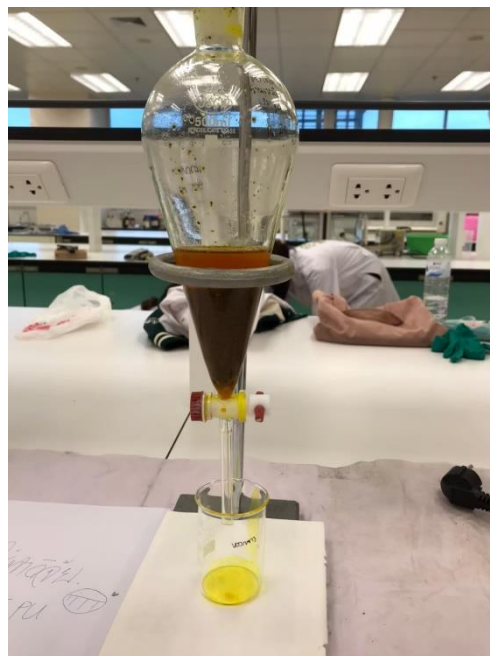
ภาพที่ 22 : ลักษณะผงของว่านเหลียง
ก่อนทำการสกัด

3.2.1 การเตรียมสารสกัดโดยวิธี percolation

ทำการชั่งวุ้นชันมดลูก และวุ้นเหลืองที่บดแล้ว ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml เติมน้ำทำละลาย 95% เอทานอล ลงไป พอให้ชุ่มผงยาและใช้ stirring rod คนให้เข้ากันแล้วพักทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที และนำแผ่นสำลีบาง ๆ ใส่ลงใน separating funnel 500 ml ต่อมาเทผงสมุนไพรที่มีตัวทำละลายลงไป สลับกับเติม 95% เอทานอล ให้ชุ่มเป็นระยะจนใส่ผงสมุนไพรครบทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำทำละลาย 95% เอทานอล ลงไปให้มีระดับสูงกว่าตัวอย่าง จนท่วมผงยา ระวังอย่าให้ด้านบนสมุนไพรแห้ง แล้วจึงปิดด้านบน separating funnel ด้วยกระดาษฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ เปิด stopcock ให้ตัวทำละลายค่อย ๆ หยดลงมาใส่ erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ด้วยความเร็ว 1 mL/min และทำการเติมน้ำทำละลายลงไปด้วยตลอดเวลา โดยเท 95% เอทานอล ใส่ลงไปใน separating funnel 500 mL จากนั้นค่อย ๆ เปิด stopcock ให้ตัวทำละลาย ค่อย ๆ หยดลง separating funnel ที่บรรจุสมุนไพร แสดงดังภาพที่ 23-24 โดยระวังอย่าให้สมุนไพรแห้ง ทำการสกัดแบบนี้จนแน่ใจว่าสารที่ไหลออกมาไม่มีสีหรือสีจาง จากนั้นนำสารสกัดไประเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่สภาวะอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ความดันเท่ากับ 190-150 mmHg แสดงดังภาพที่ 26 จนได้สารสกัดเข้มข้น แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ บันทึกผลและคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัดเทียบกับน้ำหนักของตัวอย่างสดและแห้ง (% yield w/w)



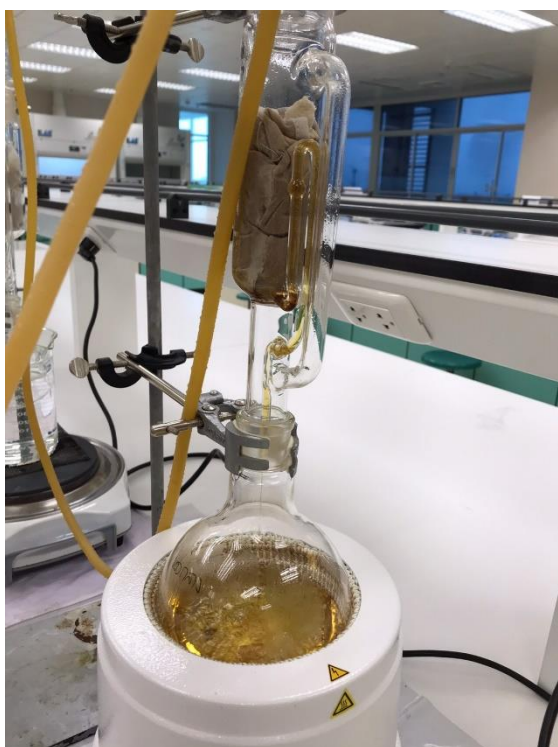
ภาพที่ 23 : การสกัดด้วยวิธี
percolation ของวุ้นชันมดลูก



ภาพที่ 24 : การสกัดด้วยวิธี
percolation ของวุ้นเหลือง

3.2.2 การเตรียมสารสกัดโดยวิธี Soxhlet

ทำการชั่งน้ำหนักว่านชักมดลูก และว่านเหลียง ใส่ลงในทิมเบล ใช้สำลีบาง ๆ ปิดด้านบนถุงสมุนไพร นำทิมเบลที่มีตัวอย่างสมุนไพรใส่ลงใน Soxhlet extractor และต่อเข้ากับขวดกักเก็บขนาด 1000 ml จากนั้นเติม 95% เอทานอล ลงไป ประมาณครึ่งหนึ่งของขวดกักเก็บ ทำการต่อท่อ cooler เข้ากับ condenser และต่อเข้ากับ Soxhlet extractor ปลอ่ยให้น้ำไหลเข้า condenser และเปิดตัวทำความร้อนเพื่อให้ความร้อนแก่ตัวทำละลาย ทำการสกัดไปเรื่อย ๆ แสดงดังภาพที่ 25 จนสังเกตเห็นสารสกัดใน Soxhlet extractor จากนั้นนำสารสกัดไประเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่สภาวะอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ความดันเท่ากับ 190-150 mmHg แสดงดังภาพที่ 26 จนได้สารสกัด แล้วชั่งน้ำหนัก บันทึกผล และคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัดเทียบน้ำหนักของตัวอย่างสดและแห้ง (% yield w/w)



ภาพที่ 25 : การสกัดด้วยวิธี Soxhlet ของ
ว่านชักมดลูก



ภาพที่ 26 : การระเหยด้วยเครื่อง Rotary
evaporator ของสารสกัด

3.3 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (79)

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยนำสารสกัด 0.5 g มาใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางพฤษเคมีเบื้องต้น ดังนี้

3.3.1 การทดสอบคูมาริน (79)

- 1) นำสารละลายตัวอย่างมาแตะลงบนกระดาษกรองและหยดด้วย 10% NaOH จำนวน 1 หยดแล้วจึงนำกระดาษกรองมาตรวจสอบการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm หากปรากฏการเรืองแสงแสดงว่ามีสารคูมารินเป็นองค์ประกอบ
- 2) นำสารสกัดมาใส่ในหลอดทดลองและเติมน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นจึงนำกระดาษกรองที่หยด 10% NaOH ให้พอชุ่มมาวางพาดไว้ที่ปากหลอดทดลองและปิดฝาเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเคลื่อนแล้วจึงนำไปอังใน water bath นาน 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำกระดาษกรองมาตรวจสอบการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm หากปรากฏการเรืองแสงแสดงว่ามีสารคูมารินเป็นองค์ประกอบ

3.3.2 การทดสอบฟลาโวนอยด์ (79)

- 1) Cyanidin test
นำสารละลายตัวอย่าง 1 ml มาใส่ในหลอดทดลองและเติม Mg ribbon 1 ชิ้น จากนั้นหยด conc.HCl จำนวน 2-3 หยด ทิ้งไว้ 20 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากปรากฏเป็นสารละลายสีชมพู แสดงว่าสารตัวอย่างมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ
- 2) FeCl₃ test
นำสารละลายตัวอย่าง 1 ml มาใส่ในหลอดทดลองและเติม 1% FeCl₃ จำนวน 2 หยด สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น หากปรากฏสีเป็นสีเขียวเข้ม แสดงว่าสารตัวอย่างมีโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก
- 3) Molish's test
นำสารละลายตัวอย่าง 1 ml มาใส่ในหลอดทดลองและเติม 5% α -naphthol จำนวน 3-4 หยด ตามด้วย conc. H₂SO₄ จำนวน 2-3 หยด สังเกตระหว่างชั้นของสารละลาย หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลเข้มอยู่ระหว่างชั้นของสารละลายและกรดซัลฟิวริก แสดงว่าสารตัวอย่างมีโครงสร้างของน้ำตาลประกอบอยู่ด้วย

3.3.3 การทดสอบแทนนิน (79)

1) 1% Gelatin test

นำสารละลายตัวอย่าง 5 ml มาละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL จากนั้นนำสารผสมที่ได้มากรองจนใส นำส่วนใสที่ได้จากการกรองมา 5 ml แล้วแบ่งสารละลายมา 4 ml เพื่อใช้เป็น control และ 1 ml มาเติม 10% NaCl จำนวน 2-3 หยดและกรองจนใส จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 3 ml แล้วเติม 1% gelatin ปริมาตร 1 ml สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น หากปรากฏตะกอนสีขาวเกิดขึ้น แสดงว่าสารตัวอย่างมีทรูแทนนินเป็นองค์ประกอบ แล้วจึงทำการทดสอบ Condensed tannin, Hydrolyzable tannin และ Phenolic compounds ในลำดับต่อไป

2) Vanillin test

นำสารละลายตัวอย่างมา 3 ml ไประเหยแห้งบน water bath จากนั้นหยด Vanillin จำนวน 3 หยดลงไป สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากปรากฏเกิดสีแดงขึ้นทันที แสดงว่าสารตัวอย่างมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ

3) Lime water test

แบ่งสารตัวอย่างจากการทดสอบ True tannins มา 2 ml แล้วเติม Lime water จำนวน 3 หยดลงไป สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น หากปรากฏตะกอนสีเหลืองเลื้อบเทาขึ้น แสดงว่าสารตัวอย่างมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ

4) FeCl_3 test

แบ่งสารตัวอย่างจากการทดสอบ True tannins มา 1 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 1 ml แล้วหยด 1% FeCl_3 จำนวน 3 หยดลงไป สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น หากปรากฏตะกอนเงินเขียวหรือเขียวดำถึงเขียวอมน้ำตาลมีแทนนินชนิดแทนนินไฮโดรไลซ์ หากปรากฏตะกอนน้ำเงินเข้มหรือเขียวถึงดำพบแทนนินชนิด Condensed tannin

3.3.4 การทดสอบอัลคาลอยด์ (79)

ถ้าหากทำการทดสอบดังด้านล่างแล้วได้ผลบวกเป็น 4 ใน 6 ของทั้งหมด แสดงว่าสารตัวอย่างมีอัลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบ

1) Dragendorff's test

นำสารละลายตัวอย่างมาเติม 5% HCl จากนั้นนำมาหยดด้วย Dragendorff's reagent ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เกิดตะกอนสีแดงส้ม

2) Mayer's test

นำสารละลายตัวอย่างมาเติม 5% HCl จากนั้นนำมาหยดด้วย Mayer's reagent ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เกิดตะกอนสีขาวเหลือง

3) Wagner's test

นำสารละลายตัวอย่างมาเติม 5% HCl จากนั้นนำมาหยดด้วย Wagner's reagent ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง

4) Tannin acid test

นำสารละลายตัวอย่างมาเติม 5% HCl จากนั้นนำมาหยดด้วย Tannic acid ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เกิดตะกอนสีขาวเหลือง

5) Hager's test

นำสารละลายตัวอย่างมาเติม 5% HCl จากนั้นนำมาหยดด้วย Hager's reagent ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เกิดตะกอนสีเหลือง

6) Kraut's test

นำสารละลายตัวอย่างมาเติม 5% HCl จากนั้นนำมาหยดด้วย Kraut's reagent ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เกิดตะกอนสีขาว

3.3.5 การทดสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (79)

1) Kedde's reagent test

แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 3 ml ไประเหยแห้งบน water bath แล้วเติม Kedde's reagent A ตามด้วย Kedde's reagent B อย่างละ 1 หยด สังเกตสีของสารที่เกิดขึ้น หากปรากฏสีแดงเข้มหลังหยดสารทดสอบทันที แสดงว่าสารตัวอย่างมีคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแลคโตนที่ไม่อิ่มตัว องค์ประกอบ

2) Libermann-Burchard's test

แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 3 ml ไประเหยแห้งบน water bath แล้วเติม acetic anhydride จำนวน 2 หยดตามด้วย conc.H₂SO₄ จำนวน 2 หยด สังเกตสีของสารที่เกิดขึ้น หากปรากฏสีเขียว แสดงว่าสารตัวอย่างมีสเตียรอยด์เป็นองค์ประกอบ หากปรากฏสีแดง แสดงว่าสารตัวอย่างมีไตรเทอร์ปินเป็นองค์ประกอบ

3) Keller-Kiliani's test

แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 3 ml และเติม 10% FeCl₃ ใน acetic acid ลงไป 1 หยด ตามด้วย conc.H₂SO₄ สังเกตระหว่างชั้นของสารละลาย หากปรากฏวงแหวนสีม่วงระหว่างชั้นสารละลายกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าสารตัวอย่างมีคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ที่มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลดีออกซีเป็นองค์ประกอบ

3.3.6 การทดสอบแอนทราควิโนน (79)

1) Modified Borntrager's test

นำสารสกัดมา 0.25 g มาละลายด้วย 10% KOH ปริมาตร 20 mL และ 3% H₂O₂ ปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไป reflux บน water bath นาน 5 นาทีแล้วจึงกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำมาปรับค่า pH ด้วย acetic acid จนมีค่า pH อยู่ที่ 3-4 แล้วทำการ partition ด้วย dichloromethane ปริมาตร 10 mL และเก็บสารละลายชั้น dichloromethane เอาไว้ จากนั้นเติมสารละลายต่าง NH₄OH TS ถ้าหากเกิดสีชมพูแดงขึ้นในชั้นของสารละลายต่าง แสดงว่าสารนั้นมีแอนทราควิโนนเป็นองค์ประกอบ

3.3.7 การทดสอบซาโปนิน (80)

1) Foam test

นำสารละลายตัวอย่าง 1 ml มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml แล้วนำไปอุ่นบน water bath นาน 5 นาทีแล้วเขย่าอย่างแรง ถ้าหากปรากฏฟองขึ้นแบบถาวร แสดงว่าสารนั้นมีซาโปนินเป็นองค์ประกอบ

3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงค์เลขผิวบางของวุ้นเหลืองและวุ้นชกมดลูก (TLC fingerprint)

3.4.1 วุ้นเหลือง (41,42)

ทำการทดสอบด้วยวิธีรงค์เลขผิวบางโดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วย Silica gel GF₂₅₄ เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และทำการทดสอบโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น 2 ระบบ ได้แก่ n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 และ toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 จากนั้นทำการกำหนดระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่เป็นระยะ 6 เซนติเมตร และใช้ capillary tube ดูดสารสกัดตัวอย่าง spot ลงบนแผ่น TLC ขนาดความยาวของ spot เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร แล้วนำ TLC plate ที่ spot สารตัวอย่างแล้วใส่ลงใน TLC tank ที่บรรจุ mobile phase และปล่อยให้สารเคลื่อนที่ตามระยะทางที่กำหนด แล้วจึงนำ TLC plate ออกปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการสังเกตตำแหน่งของ spot ต่าง ๆ ภายใต้ UV 254 และ 366 nm จากนั้นนำแผ่น TLC ของแต่ละระบบมาพ่นด้วย vanilin-sulfuric acid และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที จากนั้นให้ทำตามวิธีข้างต้นดังที่ได้กล่าวมาแล้วอีกครั้ง แต่ในครั้งนี้นำแผ่น TLC ของแต่ละระบบมาพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที จากนั้นการสังเกตสีของ spot ที่เกิดขึ้น และระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตามลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่เกิดขึ้น เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \times 100$$

3.4.2 วานซ์กมดลูก (41,42)

ทำการทดสอบด้วยวิธีรังคเลขผิวบางโดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วย Silica gel GF₂₅₄ เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และทำการทดสอบโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น 2 ระบบ ได้แก่ n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 และ toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 จากนั้นทำการกำหนดระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่เป็นระยะ 6 เซนติเมตร และใช้ capillary tube ดูดสารสกัดตัวอย่าง spot ลงบนแผ่น TLC ขนาดความยาวของ spot เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร แล้วนำ TLC plate ที่ spot สารตัวอย่างแล้วใส่ลงใน TLC tank ที่บรรจุ mobile phase และปล่อยให้สารเคลื่อนที่ตามระยะทางที่กำหนด แล้วจึงนำ TLC plate ออกปล่อยให้แห้ง จากนั้นทำการสังเกตตำแหน่งของ spot ต่าง ๆ ภายใต้ UV 254 และ 366 nm จากนั้นนำแผ่น TLC ของแต่ละระบบมาพ่นด้วย vanilin-sulfuric acid และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที จากนั้นให้ทำตามวิธีข้างต้นดังที่ได้กล่าวมาแล้วอีกครั้ง แต่ในครั้งนี้นำแผ่น TLC ของแต่ละระบบมาพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที จากนั้นการสังเกตสีของ spot ที่เกิดขึ้น และระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตามลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่เกิดขึ้น เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \times 100$$

3.5 การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic contents) (81)

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยการเจือจางสารละลาย gallic acid ด้วย 95% เอทานอล ให้มีความและเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างสารสกัดมาเจือจางด้วย 95% เอทานอล ปิเปตสารละลายมาตรฐานมา 20 μ l ใส่ลงใน 96-well plate ในแต่ละความเข้มข้นแล้วเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent 100 μ l ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารละลาย 7.5% Na₂CO₃ 80 μ l ลงไป และนำไปเขย่าให้เข้ากันในเครื่อง microplate reader นาน 10-15 วินาที แล้วนำออกมาตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องและพ่นแสงนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm และคำนวณสารประกอบฟีนอลิกรวม (μ g/ml) จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid นำเสนอเป็นค่ากรัมสมมูลของกรดแกลลิก ในสารสกัด 100 กรัม (g Gallic acid Equivalent (GAE)/ 100 g extract)

3.6 การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid contents)

(81)

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยการเจือจางสารละลาย quercetin ด้วย 95% ethanol และเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างสารสกัดมาเจือจางด้วย 95% ethanol ปิเปตสารตัวอย่าง 100 μ l และ $AlCl_3$ 100 μ l ใส่ลงใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน quercetin ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน นำเสนอเป็นค่าร้อยละของเคอซีติน ในสารสกัด 100 กรัม (g QE/ 100 g extract)

3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (81)

เตรียมสารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ที่ความเข้มข้น 125 μ M เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยละลาย trolox ด้วย 95% เอทานอล ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μ l และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 μ l ลงใน 96-well plate และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ และใช้เอทานอลเป็น control จากนั้นคำนวณค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / (A_0)] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

หาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

3.7.2 การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (81)

เตรียมสารละลายเอบีทีเอส (ABTS^{•+} reagent, (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical)) โดยการชั่งสาร ABTS 0.0036 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ml ผสมสาร potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 0.00067 g แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ก่อนนำมาใช้ และเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยละลาย trolox ด้วย 95% เอทานอล

จากนั้นทำการทดสอบสารตัวอย่างโดยผสมสารละลายตัวอย่าง 50 μ L กับสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 μ L ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm การทดลองนี้ใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ จากนั้นคำนวณค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / (A_0)] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

หาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

3.7.3 การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

(81)

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 mM acetate buffer pH 3.6, สารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM และสารละลาย TPTZ 10 mM ใน HCl 40 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

จากนั้นทำการทดสอบสารตัวอย่างโดยผสมสารละลายตัวอย่าง 50 μ L กับสารละลาย FRAP ปริมาตร 150 μ L ใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm การทดลองนี้ใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ และคำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (Ferric Reducing Antioxidant Power value) เพื่อทราบความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ trolox แสดงค่าในรูปของ $mg\ Fe^{2+} / 100\ g\ sample\ extract$

3.7.4 การตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (82,83)

การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Ellman และคณะ โดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง กับกระบวนการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะเกิดกระบวนการย่อยสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนให้เป็นโคลีน และอะเซติกแอซิด ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเป็นการทำลายสารสื่อประสาทให้ลดลง การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส นั้นจะใช้ galantamine เป็นสารมาตรฐาน และใช้อะเซทิลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide, ATCI) เป็นสับสเตรต แล้วอาศัยกระบวนการเกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับ 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid, DTNB) สุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-thio-2-nitrobenzoate anion ที่ดูดกลืนแสงสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 405 nm ทำการทดสอบโดยนำสารมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างปริมาตร 25 μ l ผสมให้เข้ากันกับสารละลายบัฟเฟอร์ 50 μ l จากนั้นเติมสารละลาย 1.5 mM ATCI ปริมาตร 25 μ l, 3 mM DTNB ปริมาตร 125 μ l และสารละลายเอนไซม์ 8.0 U/ml acetylcholinesterase ปริมาตร 25 μ l ลงใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ที่นาทีที่ 10 คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ enzyme activity และจากนั้นคำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์ (% inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / (A_0)] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

หาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสทั้งหมดนั้น จะนำผลการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) มาแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm SD$)

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มในการทดสอบโดยใช้สถิติ One Way ANOVA และใช้การเปรียบเทียบของ Post Hoc หรือการเปรียบเทียบหลายหลาย (Multiple Comparisons) ชนิด LSD (Least Significant Difference) ด้วยระดับนัยสำคัญที่ $p\text{-values} < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมสถิติวิเคราะห์ SPSS

บทที่ 4

ผลการวิจัย

พืชสมุนไพรที่ใช้นำมาทำการสกัดและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ ว่านเหลียง (*C. zedoaria Roscoe.*) และว่านชักมดลูก (*C. comosa Roxb.*) ที่ทำการเก็บมาจาก ตำบลคลองขุด อำเภอลำใหม่ จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนพฤษภาคม 2563 และได้ทำการส่งไปยังสำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพมหานครเพื่อทำการตรวจสอบและระบุชนิดซึ่งยังอยู่ในระหว่างขั้นตอนการวิเคราะห์ และนำส่วนแห้งที่ตากแห้งแล้วมาทำการสกัดและทำการวิเคราะห์ผล

4.1 การสกัดสารจากพืช

การสกัดสารจากส่วนแห้งของว่านเหลียงและว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลโดยวิธี Soxhlet และ percolation แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) และคำนวณปริมาณร้อยละของสารที่สกัดได้ (% yield w/w) ของสารสกัดหยาบ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 : ปริมาณร้อยละสารที่สกัดได้ (% yield w/w) ของสารสกัดหยาบจากพืช

สารสกัด	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)	ปริมาณผงแห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	% yield of crude extract (% w/w)
Soxhlet ว่านชักมดลูก	30.0	135.7	22.08
Percolation ว่านชักมดลูก	27.9	135.7	20.55
Soxhlet ว่านเหลียง	10.0	39.6	25.25
Percolation ว่านเหลียง	8.2	39.6	20.79

ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารสกัดของพืชที่มีปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้มากที่สุด คือ สารสกัดว่าน
 เหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ที่มีปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้เท่ากับ 25.17 และน้อยที่สุด คือ สารสกัด
 ว่านชักมดลูกด้วยวิธี percolation มีปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้เท่ากับ 20.55 และแต่ละสารสกัดของพืช
 แต่ละชนิดและแต่ละวิธีนี้มีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 5 และภาพที่ 27-30

ตารางที่ 5 : ลักษณะของสกัดเอทานอลจากส่วนเหง้าของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก

สารสกัด	ลักษณะสารสกัด
Soxhlet ว่านชักมดลูก	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ
Percolation ว่านชักมดลูก	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลดำ
Soxhlet ว่านเหลือง	ของเหลวสีเหลืองส้ม และมีกลิ่นหอม
Percolation ว่านเหลือง	ของเหลวสีเหลืองส้ม และมีกลิ่นหอม



ภาพที่ 27 : crude extract ของสารสกัดว่าน
ชั่งมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation



ภาพที่ 28 : crude extract ของสารสกัดว่านชัก
มดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet



ภาพที่ 29 : crude extract ของสารสกัดว่าน
หน่ือที่สกัดด้วยวิธี percolation



ภาพที่ 30 : crude extract ของสารสกัดว่าน
หน่ือที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet

4.2 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening tests)

การศึกษาคุณสมบัติทางพฤษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 : ผลการทดสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก

ผลการทดสอบ	สารสกัดตัวอย่างพืช			
	Soxhlet ว่านชักมดลูก	Percolation ว่าน ชักมดลูก	Soxhlet ว่าน เหลียง	Percolation ว่านเหลียง
1. Coumarins				
ระเหยได้	-	-	-	-
ระเหยไม่ได้	-	-	-	-
2. Flavonoids				
- Cyanidin test	-	-	-	-
- FeCl ₃ test	++	++	+++	+++
- Molish's test	+	+	+	+
3. Tannins				
- Gelatin test	-	-	-	-
- Vanilin test	+	+	+	+
- Lime water	-	-	+	+
- FeCl ₃ test	+	+	++	++

ผลการทดสอบ	สารสกัดตัวอย่างพืช			
	Soxhlet ว่านชักมดลูก	Percolation ว่าน ชักมดลูก	Soxhlet ว่าน เหลือง	Percolation ว่านเหลือง
4. Alkaloids				
- Dragendorff's test	+	+	+	+
- Mayer's test	+	+	+	+
- Wagner's test	+	+	+	+
- Tannin acid test	+	+	+	+
- Hager's test	+	+	+	+
- Kraut's test	+	+	+	+
5. Cardiac glycosides				
- Kedde's reagent test	-	-	-	-
- Libermann-Burchard's	+	+	+	+
- Keller-Kiliani's test	+	+	+	-
6. Anthraquinone				
- Modified Borntrager's	-	-	-	-
7. Saponin				
- Foam test	-	-	-	-

หมายเหตุ: (++++) เกิดปฏิกิริยามาก (++) เกิดปฏิกิริยาปานกลาง

(+) เกิดปฏิกิริยาน้อย (-) ไม่เกิดปฏิกิริยา

จากผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นสรุปผลได้ว่า สารสกัดวานชักมดลูกด้วยวิธี Soxhlet และ percolation พบกลุ่มสาร ฟลาโวนอยด์ ไฮโดรไลเซเบิลแทนนิน และอัลคาลอยด์ สารสกัดวานเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation พบกลุ่มสาร ฟลาโวนอยด์ ไฮโดรไลเซเบิลแทนนิน และอัลคาลอยด์

4.3 การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือโดยวิธีรงค์เลขผิวบางของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก (TLC fingerprint)

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือนิ้วด้วยวิธีรงค์เลขผิวบางของสารสกัด 95% เอทานอล ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูกจากเหง้าของพืช โดยใช้ Silica gel GF₂₅₄ เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) สำหรับระบบที่ 1 ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 หรือระบบชั่วคราวสำหรับระบบที่ 2 ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 หรือระบบชั่วคราวปานกลาง

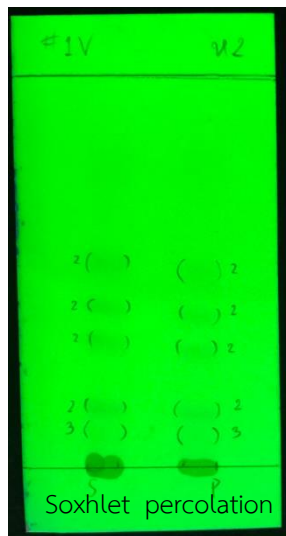
4.3.1 ว่านเหลียง

จากการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือนิ้วด้วยวิธีรงค์เลขผิวบางของว่านเหลียง โดยทำการสังเกตสีของ spot และระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตามลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่เกิดขึ้น พบว่า TLC fingerprint ของว่านเหลียงได้ผลดังตารางที่ 7-8 และดังภาพที่ 31-38

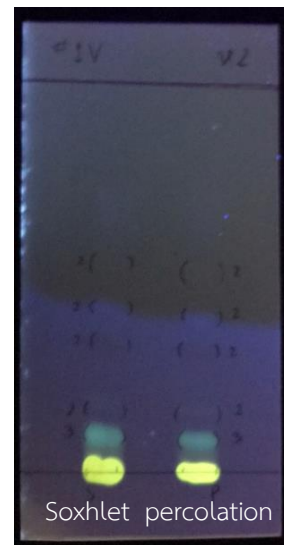
ตารางที่ 7 : แสดงลักษณะและค่า R_f ของ spot ต่าง ๆ บน TLC chromatogram ของสารสกัดว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation เมื่อใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 และพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid และ anisaldehyde/sulfuric acid

Spot	ก่อนพ่นด้วย spraying reagent			หลังพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid		หลังพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid	
	R_f (254 nm)	R_f (366 nm)	สีของ spot สารภายใต้ UV 366 nm	R_f	สีหลังพ่น	R_f	สีหลังพ่น
1	15	8	เขียวเรืองแสง	8	เงินอ่อน	12	น้ำตาลเข้ม
2	30	-	-	15	ม่วงอ่อน	28	ม่วงเข้ม
3	38	-	-	30	น้ำเงิน	38	เงินเข้ม
4	52	-	-	38	ม่วงอ่อน	48	เงินอ่อน
5	-	-	-	52	ม่วงเข้ม	78	ม่วงเข้ม
6	-	-	-	80	น้ำเงินเข้ม	-	-

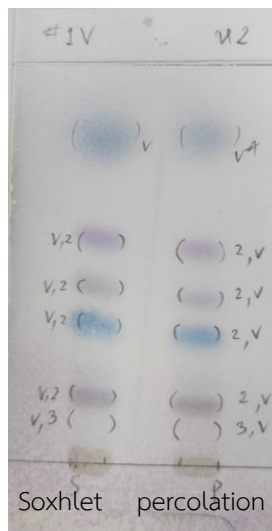
ผลการทดสอบ



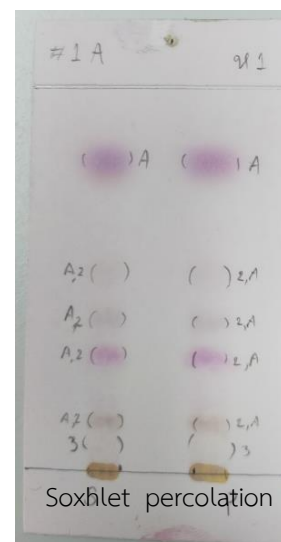
ภาพที่ 31 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm



ภาพที่ 32 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm



ภาพที่ 33 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid



ภาพที่ 34 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid

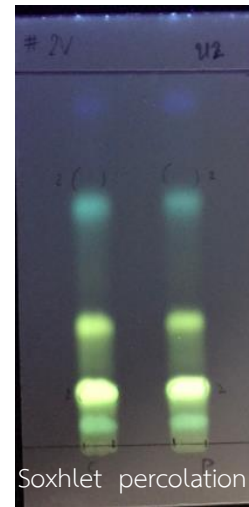
ตารางที่ 8 : แสดงลักษณะและค่า R_f ของ spot ต่าง ๆ บน TLC chromatogram ของสารสกัดว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation เมื่อใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 และพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid และ anisaldehyde/sulfuric acid

Spot	ก่อนพ่นด้วย spraying reagent			หลังพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid		หลังพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid	
	R_f (254 nm)	R_f (366 nm)	สีของ spot สารภายใต้ UV 366 nm	R_f	สีหลังพ่น	R_f	สีหลังพ่น
1	15	5	เขียวเรืองแสง	15	เหลืองเข้ม	18	เหลืองอ่อน
2	73	15	เหลืองอ่อนเรือง แสง	68	น้ำเงิน	25	เงินอ่อน
3	-	33	เหลืองเข้มเรือง แสง	73	เงินเข้ม	73	เทาเข้ม
4	-	65	ฟ้าเรืองแสง	88	ม่วงอ่อน	83	เงินเข้ม
5	-	-	-	97	เขียว	93	ม่วงอ่อน

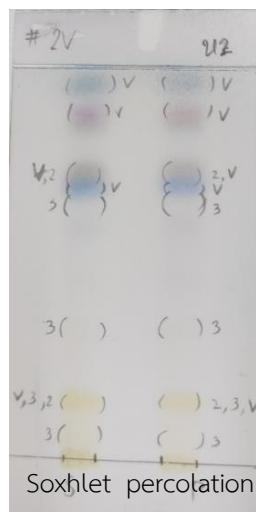
ผลการทดสอบ



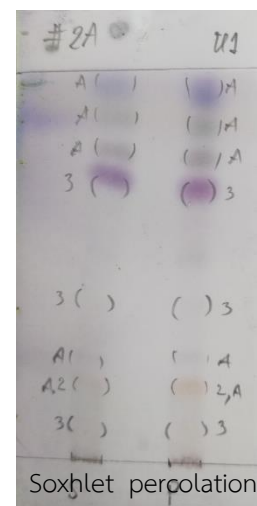
ภาพที่ 35 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm



ภาพที่ 36 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm



ภาพที่ 37 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid



ภาพที่ 38 : สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงค์เลขฉิวบางของระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 ที่ภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ reagent (ภาพที่ 31-32) โดยที่แถบสารสกัดส่วนใหญ่จะเห็นได้ที่ UV 366 nm ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากภาพลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ของสารสกัดระบบข้าวตำ พบว่า การสกัดด้วยวิธี Soxhlet (S) และการสกัดด้วยวิธี percolation (P) นั้นให้ผลลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่คล้ายกันเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ ด้วย spraying reagent แสดงผลดังนี้

1. UV 254 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 4 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 15, 30, 38 และ 52

2. UV 366 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 1 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 8 ขึ้นเป็นแถบสีเขียว

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงค์เลขฉิวบางของระบบที่ 1 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 ที่หลังพ่น vanillin-sulfuric acid และ anisaldehyde/sulfuric acid หลังให้ด้วยความร้อน (ภาพที่ 33-34) แสดงผลดังนี้

1. vanillin-sulfuric acid มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 6 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 8, 15, 30, 38, 52 และ 80 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีน้ำเงินและม่วง

2. anisaldehyde/sulfuric acid มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 5 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 12, 28, 38, 48 และ 78 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีม่วงและเงิน

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงค์เลขฉิวบางของระบบ วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 หรือระบบข้าวปานกลางเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ reagent (ภาพที่ 35-36) โดยแถบสารสกัดส่วนใหญ่จะเห็นได้ที่ UV 366 nm ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากภาพลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ของสารสกัดระบบข้าวปานกลาง พบว่า การสกัดด้วยวิธี Soxhlet (S) และการสกัดด้วยวิธี percolation (P) นั้นให้ผลลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่คล้ายกันเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ ด้วย spraying reagent แสดงผลดังนี้

- UV 254 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 2 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 15 และ 73

- UV 366 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 4 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 5, 15, 33 และ 65 สีที่ขึ้นโดยส่วนใหญ่จะเป็นสีเหลือง

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีแรงเคลื่อนขั้วบางของระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene :
 chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 ที่หลังพ่น vanillin-sulfuric acid และ
 anisaldehyde/sulfuric acid หลังให้ความร้อน (ภาพที่ 37-38) แสดงผลดังนี้

1. vanillin-sulfuric acid = มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 5 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 18, 25, 73, 83 และ 93 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีเหลือง

2. anisaldehyde/sulfuric acid = มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 5 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 12, 28, 38, 48 และ 78 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีม่วง

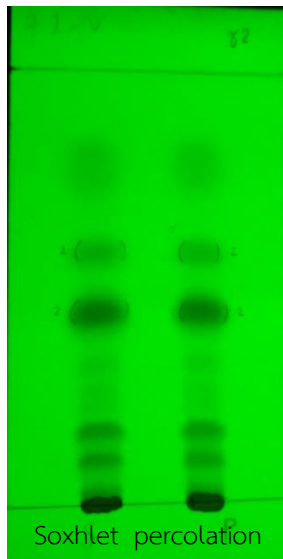
4.3.2 วานชักมดลูก

จากการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังเคลขผิวบางของวานชักมดลูก โดยทำการสังเกตสีของ spot และระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตามลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่เกิดขึ้น พบว่า TLC fingerprint ของวานชักมดลูกได้ผลดังตารางที่ 9-10 และภาพที่ 39-46

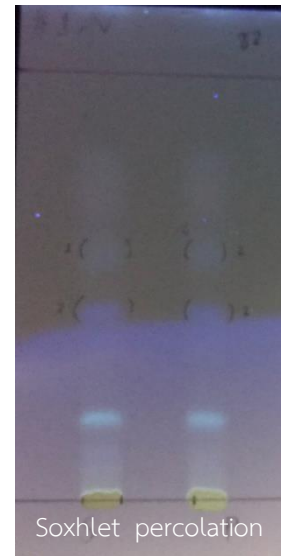
ตารางที่ 9 : แสดงลักษณะและค่า R_f ของ spot ต่าง ๆ บน TLC chromatogram ของสารสกัดวานชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation เมื่อใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 และพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid และ anisaldehyde/sulfuric acid

Spot	ก่อนพ่นด้วย spraying reagent			หลังพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid		หลังพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid	
	R_f (254 nm)	R_f (366 nm)	สีของ spot สารภายใต้ UV 366 nm	R_f	สีหลังพ่น	R_f	สีหลังพ่น
1	10	20	ฟ้าเรืองแสง	3	ชมพูอ่อน	3	น้ำตาลอ่อน
2	17	45	น้ำเงินอ่อนเรือง แสง	10	เงินเข้ม	10	ม่วงอ่อน
3	33	58	เขียวอ่อนเรือง แสง	17	ม่วงอ่อน	15	น้ำตาลเข้ม
4	45	79	น้ำเงินอ่อนเรือง แสง	20	น้ำเงินอ่อน	23	ม่วงอ่อน
5	58	-	-	25	น้ำเงินเข้ม	31	ม่วงอ่อน
6	79	-	-	33	น้ำเงินเข้ม	42	ม่วงเข้ม
7	-	-	-	45	ม่วงเข้ม	56	ม่วงอ่อน
8	-	-	-	58	ม่วง	76	เหลืองเข้ม
9	-	-	-	73	ฟ้าอ่อน	81	ม่วงแดง
10	-	-	-	79	ชมพูเข้ม	-	-

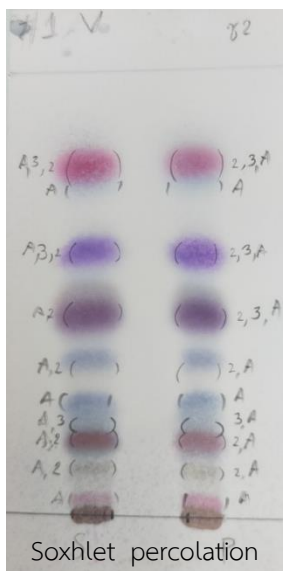
ผลการทดสอบ



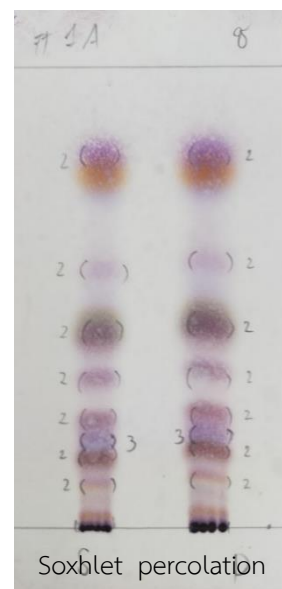
ภาพที่ 39 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm



ภาพที่ 40 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm



ภาพที่ 41 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid

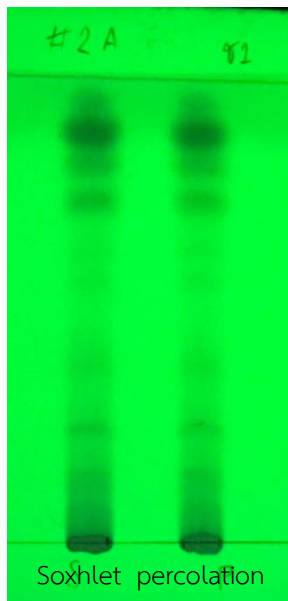


ภาพที่ 42 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค n-hexane : ethyl acetate (93:7) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid

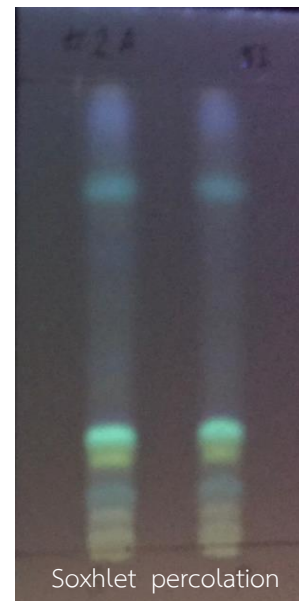
ตารางที่ 10 : แสดงลักษณะและค่า R_f ของ spot ต่าง ๆ บน TLC chromatogram ของสารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation เมื่อใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 และพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid และ anisaldehyde/sulfuric acid

Spot	ก่อนพ่นด้วย spraying reagent			หลังพ่นด้วย vanillin-sulfuric acid		หลังพ่นด้วย anisaldehyde/sulfuric acid	
	R_f (254 nm)	R_f (366 nm)	สีของ spot สาร ภายใต้ UV 366 nm	R_f	สีหลังพ่น	R_f	สีหลังพ่น
1	22	3	เหลืองอ่อนเรืองแสง	3	ม่วงอ่อน	3	ม่วงอ่อน
2	35	6	เหลืองอ่อนเรืองแสง	6	เงินเข้ม	6	น้ำตาลอ่อน
3	52	11	น้ำเงินอ่อนเรืองแสง	11	เงินเข้ม	12	ม่วงอ่อน
4	70	18	เหลืองอ่อนเรืองแสง	14	เงินเข้ม	18	ม่วงอ่อน
5	80	22	เขียวอ่อนเรืองแสง	18	เงินอ่อน	28	เงินอ่อน
6	90	75	ฟ้าอ่อนเรืองแสง	22	ชมพูอ่อน	37	เหลืองเข้ม
7	97	80	น้ำเงินอ่อนเรืองแสง	35	เงินอ่อนมาก	55	ม่วงอ่อน
8	-	90	น้ำเงินเข้มเรืองแสง	52	เงินอ่อน	60	เงินอ่อน
9	-	97	น้ำเงินเข้มเรืองแสง	58	ฟ้าอ่อน	68	ม่วง
10	-	-	-	64	เงินเข้ม	73	เงินเข้ม
11	-	-	-	70	เงินเข้ม	77	เงินอ่อน
12	-	-	-	75	ฟ้าอ่อน	80	น้ำตาลเข้ม
13	-	-	-	80	ม่วงเข้ม	88	ม่วงอ่อน
14	-	-	-	90	ม่วง	93	เหลืองเข้ม
15	-	-	-	97	ม่วงแดง	98	ม่วงแดง

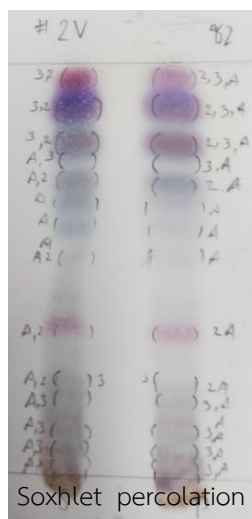
ผลการทดสอบ



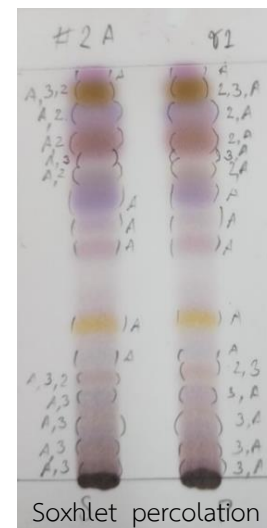
ภาพที่ 43 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm



ภาพที่ 44 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm



ภาพที่ 45 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ vanillin-sulfuric acid



ภาพที่ 46 : สารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ที่ทำการแยกด้วยวัฏภาค toluene : chloroform : absolute ethanol (49:49:2) และทำการพ่นน้ำยาทดสอบ anisaldehyde/sulfuric acid

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงเคลขผิวบางของระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 ที่ภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ reagent (ภาพที่ 39-40) โดยที่แถบสารสกัดส่วนใหญ่จะเห็นได้ที่ UV 366 nm ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากภาพลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ของสารสกัดระบบข้าวตำ พบว่า การสกัดด้วยวิธี Soxhlet (S) และการสกัดด้วยวิธี percolation (P) นั้นในให้ผลลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่คล้ายกันเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ ด้วย spraying reagent แสดงผลดังนี้

1. UV 254 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 6 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 10, 17, 33, 45, 58 และ 79

2. UV 366 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 4 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 20, 45, 58 และ 79 สีที่ขึ้นโดยส่วนใหญ่เป็นแถบสีน้ำเงิน

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงเคลขผิวบางของระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 ที่หลังพ่น vanillin-sulfuric acid และ anisaldehyde/sulfuric acid หลังให้ความร้อน (ภาพที่ 41-42) แสดงผลดังนี้

1. vanillin-sulfuric acid มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 10 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 3, 10, 17, 20, 25, 33, 45, 58, 73 และ 79 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีม่วงและน้ำเงิน

2. anisaldehyde/sulfuric acid มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 9 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 3, 10, 15, 23, 31, 42, 56, 76 และ 81 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีม่วง

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรงเคลขผิวบางของระบบเคลื่อนที่ toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 หรือระบบข้าวปานกลางเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ reagent (ภาพที่ 43-44) โดยที่แถบสารสกัดส่วนใหญ่จะเห็นได้ที่ UV 366 nm ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากภาพลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ของสารสกัดระบบข้าวปานกลาง พบว่า การสกัดด้วยวิธี Soxhlet (S) และการสกัดด้วยวิธี percolation (P) นั้นในให้ผลลายพิมพ์นิ้วมือ TLC ที่คล้ายกันเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ 366 nm ก่อนพ่นสเปรย์ ด้วย spraying reagent แสดงผลดังนี้

1. UV 254 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 7 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 22, 35, 52, 70, 80, 90 และ 97

2. UV 366 nm มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 9 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 3, 6, 11, 22, 75, 80, 90 และ 97 สีที่ขึ้นโดยส่วนใหญ่เป็นสีน้ำเงินและเหลือง

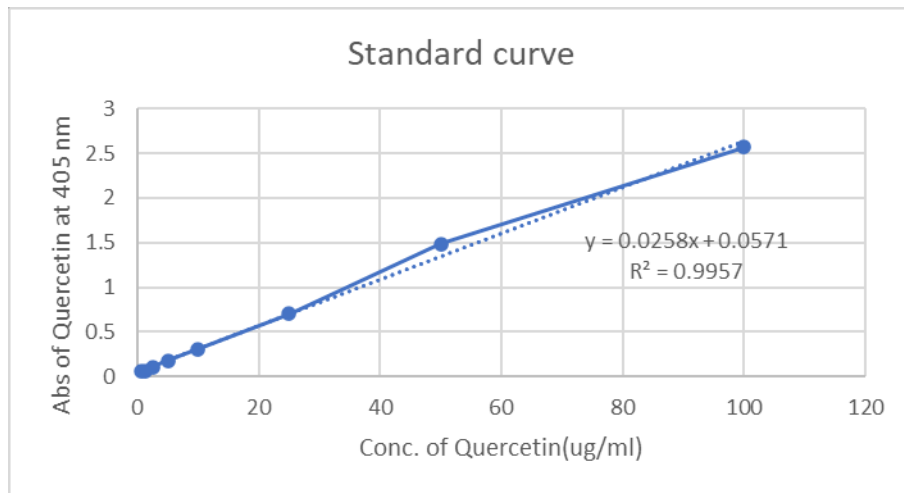
การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังเคเลขวางของระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene :
 chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 ที่หลังพ่น vanillin-sulfuric acid และ
 anisaldehyde/sulfuric acid หลังให้ความร้อน (ภาพที่ 45-46) แสดงผลดังนี้

1. vanillin-sulfuric acid มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 15 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 3, 6, 11, 14, 18, 22, 35, 52, 58, 64, 70, 75, 80, 90 และ 97 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีเงินและม่วง

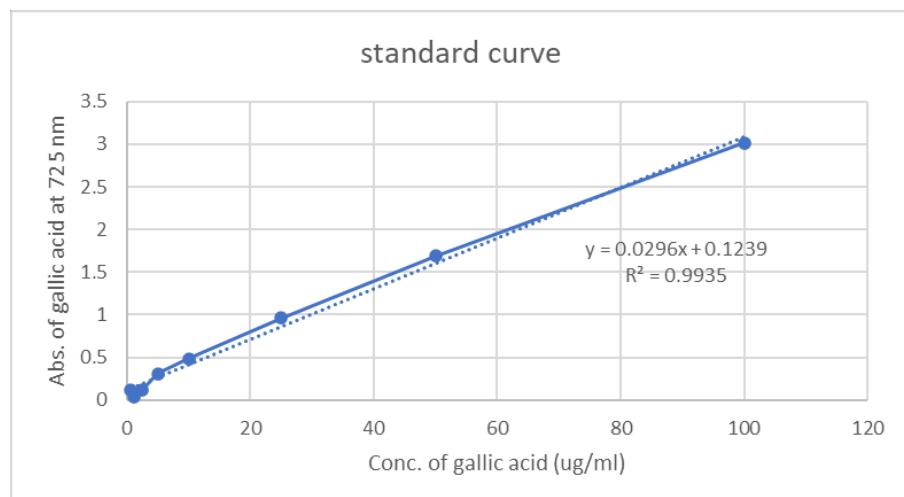
2. anisaldehyde/sulfuric acid มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 15 แถบ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) คือ 12, 28, 38, 48 และ 78 สีที่ขึ้นส่วนใหญ่ให้แถบสีม่วงและเงิน

4.4 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสารมาตรฐาน quercetin แล้วรายงานในหน่วยของ g QE/100 g extract ดังแสดงในภาพที่ 47 และสารมาตรฐาน gallic acid แล้วรายงานในหน่วยของ g GAE/100 g extract ดังแสดงในภาพที่ 48 ตามลำดับโดยแสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 11



ภาพที่ 47 : กราฟมาตรฐานของ quercetin



ภาพที่ 48 : กราฟมาตรฐานของ gallic acid

ตารางที่ 11 : การทดสอบการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม
ของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก

สารสกัด	Total flavonoid (g QE/100 g extract)	Total phenolic (g GAE/100 g extract)
Soxhlet ว่านชักมดลูก	2.5±0.1	18.2±0.2
Percolation ว่านชักมดลูก	2.9±1.0	21.1±3.4
Soxhlet ว่านเหลียง	12.2±1.4	16.9±3.1
Percolation ว่านเหลียง	8.7±1.0	15.8±0.9

จากการศึกษาการทดสอบการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของว่านเหลียงและว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation พบว่าในว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet จะมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด และรองลงมาคือว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี percolation ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation และว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ตามลำดับ โดยพบว่าในว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet จะมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 12.2 ± 1.4 g QE/100 g extract และจากการตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก พบว่าในว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด และรองลงมาคือว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี percolation ตามลำดับ โดยจะพบว่า ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดเท่ากับ 21.1 ± 3.4 g GAE/100 g extract

4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

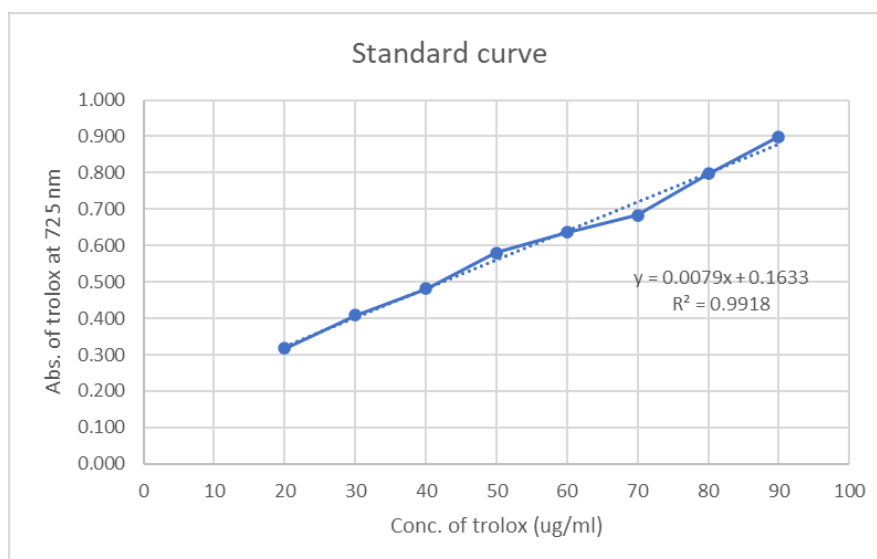
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP แสดงกราฟสารมาตรฐาน trolox ดังภาพที่ 49 และผลการทดลองดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก

สารสกัด	IC ₅₀ (µg/mL)		FRAP (mg Fe ²⁺ / 100 g sample extract)
	DPPH	ABTS	
Soxhlet ว่านชักมดลูก	51.0±4.4 ^a	23.2±0.9 ^a	28.9±5.6 ^b
Percolation ว่านชักมดลูก	53.1±3.2 ^a	22.6±0.9 ^a	20.9±2.9 ^c
Soxhlet ว่านเหลือง	238.1±4.2 ^b	19.9±0.2 ^b	2.5±1.7 ^a
Percolation ว่านเหลือง	872.4±4.5 ^c	17.9±1.2 ^c	1.9±0.6 ^a
Trolox (positive control)	9.1±0.5 ^d	0.7±0.0 ^d	-

หมายเหตุ : ตัวอักษรตัวเดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



รูปที่ 49 : กราฟมาตรฐาน trolox ด้วยวิธี FRAP

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH รายงานค่าเป็น IC_{50} ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 โดยใช้สารมาตรฐาน trolox (IC_{50} เท่ากับ 9.1 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$) เป็น positive control พบว่าวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation มีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.0 ± 4.4 และ 53.1 ± 3.2 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ วุ้นเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation มีค่า IC_{50} เท่ากับ 238.1 ± 4.2 และ 872.4 ± 4.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังนั้นฤทธิ์อนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดเนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.0 ± 4.4 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 12

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS รายงานค่าเป็น IC_{50} โดยใช้สารมาตรฐาน trolox (IC_{50} เท่ากับ 0.7 ± 0.0 $\mu\text{g/mL}$) เป็น positive control พบว่าวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.2 ± 0.9 และ 22.6 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ วุ้นเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation มีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.9 ± 0.2 และ 17.9 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดวุ้นเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.9 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 12

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP รายงานค่าเป็น $\text{mg Fe}^{2+} / 100 \text{ g sample extract}$ เทียบกับกราฟมาตรฐานของ trolox เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบในสารสกัดทั้งหมดพบว่า สารสกัดวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation และวุ้นเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet

และ percolation ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ $28.9 \pm 5.6 \text{ mg Fe}^{2+} / 100 \text{ g sample extract}$ ดังแสดงในตารางที่ 12

4.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ Percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (500, 400, 300, 250, 200, 100 $\mu\text{g/ml}$) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน galantamine ด้วยวิธี Ellman's method (82,83) โดยแสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 : ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก

สารสกัด	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Soxhlet ว่านชักมดลูก	$> 500^a$
Percolation ว่านชักมดลูก	$> 500^a$
Soxhlet ว่านเหลียง	192.2 ± 9.5^b
Percolation ว่านเหลียง	237.5 ± 16.7^c
Galantamine (positive control)	2.8 ± 0.1^d

หมายเหตุ : ตัวอักษรตัวเดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยวิธี Ellman's method รายงานค่าเป็น IC_{50} ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 50 โดยใช้สารมาตรฐาน galantamine (IC_{50} เท่ากับ 2.8 ± 0.1 $\mu\text{g/ml}$) เป็น positive control เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 13 พบว่าวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation มีค่าการยับยั้งต่ำกว่าร้อยละ 50 โดยที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 23.2 ± 11.3 และ 21.7 ± 19.4 ตามลำดับ วุ้นเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation มีค่า IC_{50} เท่ากับ 192.2 ± 9.5 และ 237.5 ± 16.7 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุดคือสารสกัดวุ้นชันมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 192.2 ± 9.5 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 13

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening tests) และการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม

จากผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยวิธี Soxhlet และ percolation จะพบกลุ่มสารพฤษเคมี ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ไฮโดรไลเซเบิลแทนนิน และอัลคาลอยด์ สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation จะพบกลุ่มสารพฤษเคมี ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ไฮโดรไลเซเบิลแทนนิน และอัลคาลอยด์

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจากการศึกษาในปี 2017 ของระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ (83) มีการศึกษา phytochemical screening ของว่านชักมดลูกซึ่งอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae พบว่ามีสารกลุ่ม ไตแรลเฮปทานอยด์ เคอร์คูมินอยด์ ไตรเทอร์ปีนอยด์ เทอร์พีน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนิน เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสารที่พบส่วนใหญ่ของพืชวงศ์ Zingiberaceae พบสารจำพวก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน ไตรเทอร์ปีนอยด์ และอัลคาลอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้วิธี $AlCl_3$ colorimetric assay พบว่าจากการศึกษาการทดสอบการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก พบว่าในสารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 12.2 ± 1.4 g QE/100 g extract รองลงมาคือ ว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation และว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2019 ของ Sandrasari และคณะ (84) ได้ทำการศึกษาศารสกัดเอทานอลจากเหง้าของว่านเหลือง พบปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 58.69 ± 0.03 mg QE/g extract และการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin – Ciocalteu assay พบว่าจากการศึกษาการทดสอบการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก พบว่าปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation มีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 21.1 ± 3.4 g GAE/100 g extract รองลงมาคือ ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2020 ของ Burapan และคณะ (85) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของพืชในสกุล *Curcuma* 23 ชนิดที่พบในประเทศไทย โดยทำการสกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้เอทานอลเป็น

ตัวทำละลาย และใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และใช้วิธี DPPH radical scavenging ในการวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าวุ้นช้กมดลูกพบปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 4.2 ± 0.1 mg GAE/ g ของน้ำหนักแห้ง และมีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 90.0 ± 0.3 ซึ่งมีความใกล้เคียงกันกับฤทธิ์ของสารสกัดวุ้นช้กมดลูกที่ทำการศึกษา แสดงว่าสารประกอบฟีนอลิกจะมีความสัมพันธ์กันกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยหากพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในปริมาณที่สูงจะมีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (scavenging effect) ที่ดี

5.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางพิษวิทยาเบื้องต้นด้วยวิธีรังเคเลขผิวบาง

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังเคเลขผิวบาง ทำการตรวจสอบ 2 ระบบ ดังนี้ ระบบที่ 1 เป็น n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 สำหรับระบบที่ 2 เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 เพื่อทำการตรวจสอบดูความมีขั้วของของกลุ่มสารแต่ละชนิด โดยที่สามารถดูได้จากกระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร (R_f) ซึ่งจะพบว่า ในระบบที่ 2 มีการเคลื่อนที่ของกลุ่มสารมากกว่าระบบที่ 1 เนื่องจากคาดว่าโครงสร้างของสารสกัดนั้นมีความเป็นขั้วปานกลางอยู่มาก และเพราะว่าระบบที่ 2 เป็นระบบที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขั้วมากกว่าระบบที่ 1

จากผลการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังเคเลขผิวบาง ของสารสกัดวุ้นช้กมดลูกที่ได้จากจังหวัดจันทบุรี พบว่า ในวิธีการสกัดด้วย Soxhlet และ percolation นั้นให้ผลที่เหมือนกัน ดังนั้นจึงคาดได้ว่า การสกัดทั้ง 2 แบบไม่มีผลต่อการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังเคเลขผิวบาง ส่วนในสารสกัดจากเหง้าของวุ้นช้กมดลูก พบว่าในระบบที่ 1 n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 นั้นเป็นเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความมีขั้วค่อนข้างต่ำ เกิด quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm และจะพบแถบสาร 1 แถบที่ UV 366 nm แต่ในระบบที่ 2 เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 นั้นเป็นเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความมีขั้วปานกลาง จะพบ quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm และจะพบแถบสาร 4 แถบที่ UV 366 nm ซึ่งคาดว่าระบบที่ 2 สามารถที่จะแยกกลุ่มสารที่ในโครงสร้างมี chromophore ได้มากกว่าระบบที่ 1 และในการตรวจสอบนี้ใช้ spraying reagent เป็น vanillin-sulfuric acid ใช้ในการทดสอบสารกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ อนุพันธ์ของฟีนิลโพรเพน ฟีนอลิก และซาโปนิน เป็นต้น (86,87) ซึ่งอัลคาลอยด์เป็นสารที่มีรสขม และจะมีผลบวกที่ได้ คือ สีน้ำเงินหรือฟ้า (87) และ anisaldehyde/sulfuric acid ซึ่งน้ำยาพ่นนี้ใช้ในการทดสอบสารกลุ่ม สารต้านอนุมูลอิสระ สเตียรอยด์ ฟีนอลิก ไกลโคไซด์ และเทอร์พีน เป็นต้น (88) ซึ่งสเตียรอยด์จะมีผลบวกที่ได้คือ สีม่วง (89) เมื่อพิจารณาค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R_f) และสีในแต่ละแถบบนแผ่น TLC หลัง spraying reagent พบว่า ในระบบที่ 1 พบสีน้ำเงินที่ค่า R_f เท่ากับ 30 และ 80 และพบสีม่วงค่า R_f เท่ากับ 28 และ 78 ส่วนในระบบที่ 2 พบสีน้ำเงินที่ค่า R_f เท่ากับ 68 และพบสีม่วงค่า

hR_f เท่ากับ 93 ซึ่งคาดว่าสีน้ำเงินหรือสีฟ้าน่าจะเป็นกลุ่มสารอัลคาลอยด์ และสีม่วงน่าจะเป็นกลุ่มสารสเตียรอยด์

จากผลการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง ของสารสกัดว่านชักมดลูกที่ได้จากจังหวัด จันทบุรี พบว่า ในวิธีการสกัดด้วย Soxhlet และ percolation นั้นให้ผลที่เหมือนกัน ดังนั้นจึงคาดว่า การสกัดทั้ง 2 แบบไม่มีผลต่อการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง ส่วนในสารสกัดจากเหง้าของว่านชักมดลูก พบว่าในระบบที่ 1 n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 93:7 นั้นเป็นเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความมีความมีขั้วค่อนข้างต่ำ เกิด quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm และจะพบแถบสาร 4 แถบที่ UV 366 nm แต่ในระบบที่ 2 เป็น toluene : chloroform : absolute ethanol ในอัตราส่วน 49:49:2 นั้นเป็นเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความมีความมีขั้วปานกลาง จะพบ quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm และจะพบแถบสาร 9 แถบที่ UV 366 nm ซึ่งคาดว่าระบบที่ 2 สามารถที่จะแยกกลุ่มสารที่อยู่ในโครงสร้างมี chromophore ได้มากกว่าระบบที่ 1 และในการตรวจสอบนี้ใช้ spraying reagent เป็น vanillin-sulfuric acid ใช้ในการทดสอบสารเทอร์พีนอยด์ อนุพันธ์ของฟีนิลโพรเพน ฟีนอลิก และซาโปนิน เป็นต้น (86,87) ซึ่งอัลคาลอยด์เป็นสารที่มีรสขม และจะมีผลบวกที่ได้ คือ สีน้ำเงินหรือฟ้า (87) และ anisaldehyde/sulfuric acid ซึ่งน้ำยาพ่นนี้ใช้ในการทดสอบ สารต้านอนุมูลอิสระ สเตียรอยด์ ฟีนอลิก ไกลโคไซด์ และเทอร์พีน เป็นต้น (88) ซึ่งสเตียรอยด์จะมีผลบวกที่ได้คือ สีม่วง (89) เมื่อพิจารณาค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (hR_f) และสีในแต่ละแถบบนแผ่น TLC หลัง spraying reagent พบว่า ในระบบที่ 1 พบสีน้ำเงินที่ค่า hR_f เท่ากับ 20, 25, 33 และ 73 และพบสีม่วงค่า hR_f เท่ากับ 10, 23, 31, 42, 56 และ 81 ส่วนในระบบที่ 2 พบสีฟ้าอ่อนที่ค่า hR_f เท่ากับ 58 และ 75 และพบสีม่วงค่า hR_f เท่ากับ 3, 12, 18, 55, 68, 88 และ 98 ซึ่งคาดว่าสีน้ำเงินหรือสีฟ้าน่าจะเป็นกลุ่มสารอัลคาลอยด์ และสีม่วงน่าจะเป็นกลุ่มสารสเตียรอยด์

โดยสรุปจากการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง ด้วยการใช้ spraying reagent เป็น vanillin-sulfuric acid ตรวจพบกลุ่มสารอัลคาลอยด์ และจะให้ผลบวก คือ สีน้ำเงินหรือฟ้า และ anisaldehyde/sulfuric acid ตรวจสอบกลุ่มสารสเตียรอยด์ได้และจะให้ผลบวก คือ สีม่วง ดังนั้น ผลการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขผิวบางของสารสกัดว่านเหลืองและว่านชักมดลูก พบกลุ่มสารอัลคาลอยด์ในพืชทั้งสองชนิด แต่ในว่านชักมดลูกน่าจะพบกลุ่มสารสเตียรอยด์มากกว่าว่านเหลือง และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการตรวจสอบทางพิษเคมีเบื้องต้นของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก ที่พบกลุ่มสารอัลคาลอยด์เช่นกัน

อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2018 ของ Myint และคณะ (90) ทำการศึกษาเปรียบเทียบสาร curcumin ในพืชสกุล *Curcuma* ทั้ง 4 ชนิดในประเทศพม่า โดยที่พืชชนิดหนึ่งในนั้น คือ ว่านชักมดลูก (*C. comosa*) ทำการศึกษาด้วยวิธีการตรวจสอบคุณสมบัติทางพิษเคมีเบื้องต้น พบสาร อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์

รอยด์ เทอร์พีน ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และแทนนิน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2013 Negi และคณะ (91) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางพฤกษเคมีเบื้องต้นและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีจากเหง้าของพืชสกุล *Curcuma* ทั้ง 3 ชนิด โดยที่พืชชนิดหนึ่งในนั้น คือ ว่านเหลือง (*C. zedoaria*) ทำการศึกษด้วยวิธีรังสีเอกซ์และส่องภายใต้ UV 425.5 nm พบสาร ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2018 ของ Tan (92) ทำการตรวจสอบ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน ของพืช Pogang gan (*Curcuma* sp.) โดยที่พืชชนิดหนึ่งในนั้น คือ ว่านเหลือง (*C. zedoaria*) ซึ่งการใช้ส่วนเหง้า และส่วนปลายของลำต้นในการตรวจสอบอัลคาลอยด์ทำโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) พบว่าตรวจพบสาร อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน เป็นต้น

อย่างไรก็ตามข้อมูลทั้งหมดที่ใช้ในการเปรียบเทียบนี้ เป็นเพียงการสันนิษฐานเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งต้องมีการยืนยันด้วยวิธีที่จำเพาะมากกว่าด้วยวิธีรังสีเอกซ์และส่องภายใต้ UV เช่น เทคนิค HPLC H-NMR เป็นต้น

5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดว่านขมิ้นดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดเนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ $51.0 \pm 4.4 \mu\text{g/mL}$ รองลงมาคือ ว่านขมิ้นดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation ว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2020 ของ Burapan และคณะ (85) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของพืชในสกุล *Curcuma* 23 ชนิดที่พบในประเทศไทย พบว่า ว่านขมิ้นดลูกพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ $4.2 \pm 0.1 \text{ mg GAE/g}$ ของน้ำหนักแห้ง และมีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 90.0 ± 0.3 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงในสารสกัดตัวอย่าง กล่าวคือ สารสกัดจากว่านขมิ้นดลูกที่สกัดด้วยเอทานอลที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงก็จะแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยที่สารสกัดเอทานอลของว่านขมิ้นดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $17.9 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ รองลงมาคือ ว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ว่านขี้มดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation และ ว่านขี้มดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ตามลำดับ

จากการทดสอบหาความเป็น reducing power ของสารสกัดโดยใช้วิธี FRAP พบว่า สารสกัดว่านขี้มดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ $28.9 \pm 5.6 \text{ mg Fe}^{2+} / 100 \text{ g sample extract}$ รองลงมาคือ ว่านขี้มดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation และว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ตามลำดับ

จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณสารสำคัญชนิดต่างๆที่ศึกษาต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในว่านขี้มดลูกและว่านเหลืองพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในว่านขี้มดลูก น่าจะมีบทบาทและความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มากที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ ทำให้สารอนุมูลอิสระที่ได้เสถียร ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากว่านเหลืองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่ดีกว่าสารสกัดว่านขี้มดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.4 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสด้วยวิธี Ellman's method ของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลืองและว่านขี้มดลูก พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสสูงที่สุดคือ สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $192.2 \pm 9.5 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2012 ของ Abbasi และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสาร curcumin ในสารสกัดเมทานอลของขมิ้น (*C. longa*) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกันของว่านเหลืองและว่านขี้มดลูกโดยใช้วิธี column chromatography พบว่าสาร curcumin ที่พบมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส บิวทีริลโคลีนเอสเตอเรส ลิพอกซีจีเนส และ ทร립ซิน และสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2011 ของ Rungsaeng และคณะ (93) ได้ทำการศึกษาโดยการนำส่วนสกัด 15 ชนิดในพืชวงศ์ Zingiberaceae ที่มีความสามารถด้านการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่สุด โดยส่วน crude extract และ crude protein ของไพลดำ มีความสามารถยับยั้งการทำงานของอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุด คือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02240 ± 0.052 และ $0.13730 \pm 0.055 \text{ mg/mL}$ ตามลำดับ ส่วน crude protein ของว่านเหลือง มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.3939 \pm 0.019 \text{ mg/mL}$

5.5 สรุปผลการศึกษา

ว่านชักมดลูกและว่านเหลืองเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยามากมายและใช้ประโยชน์มาตั้งแต่สมัยโบราณ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดจากว่านชักมดลูกและว่านเหลืองด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ตัวทำละลายคือ 95% เอทานอล โดยทำการศึกษาทดสอบคุณสมบัติทางพิษเคมีเบื้องต้น การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขฉิวบาง ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

จากการศึกษาพบว่า ในการทดสอบคุณสมบัติทางพิษเคมีเบื้องต้น สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยวิธี Soxhlet และ percolation และสารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และ percolation จะพบกลุ่มสารพิษเคมี ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ไฮโดรไลเซเบิลแทนนิน และอัลคาลอยด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด พบว่า ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation จะมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 21.1 ± 3.4 g GAE/100 g extract รองลงมาคือ ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet และว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation ตามลำดับ และปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet จะมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 12.2 ± 1.4 g QE/100 g extract รองลงมาคือ ว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี percolation และว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet ตามลำดับ

การตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขฉิวบาง ด้วยการใช้ spraying reagent เป็น vanillin-sulfuric acid สามารถตรวจพบสารอัลคาลอยด์ และจะให้ผลบวก คือ สีน้ำเงินหรือสีฟ้า และ anisaldehyde/sulfuric acid สามารถตรวจสอบสเตียรอยด์ และจะให้ผลบวก คือ สีม่วง ดังนั้น ผลการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีรังคเลขฉิวบางของสารสกัดว่านเหลืองและว่านชักมดลูก คือ น่าจะพบกลุ่มสาร alkaloid ในพืชทั้งสองชนิด แต่ในว่านชักมดลูกน่าจะพบกลุ่มสารสเตียรอยด์มากกว่าว่านเหลือง และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการตรวจสอบทางพิษเคมีเบื้องต้นของว่านเหลืองและว่านชักมดลูก ว่าน่าจะพบกลุ่มสารอัลคาลอยด์เช่นกัน

และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดว่านเหลืองที่สกัดด้วยวิธี percolation มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ 17.9 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยวิธี ABTS และสารสกัดว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.0 ± 4.4 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยวิธี DPPH และมีค่าความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 28.9 ± 5.6 mg Fe^{2+} /100 g sample extract ด้วยวิธี FRAP เนื่องจากค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารสกัดจากว่านชักมดลูกที่สกัดด้วย

เอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงและมีค่า IC_{50} ที่ต่ำ จึงแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดอื่น ๆ ในวิธี DPPH และ FRAP ($p < 0.05$)

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยวิธี Ellman's method ของสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Soxhlet และ percolation ของว่านเหลียงและว่านชักมดลูก พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุดคือ สารสกัดว่านเหลียงที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $192.2 \pm 9.5 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งสัมพันธ์กับการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เนื่องจากสารสกัดว่านเหลียงมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดจึงทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสดีที่สุด

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ถือเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับ ฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลส่วนเหง้าของว่านชักมดลูกและว่านเหลียง ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจศึกษาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ในการเสริมความจำในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม และจากการศึกษานี้ควรแนะนำให้ใช้สารสกัดเอทานอลส่วนเหง้าของว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet หากต้องการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมเนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง และใช้สารสกัดเอทานอลส่วนเหง้าของว่านเหลียงด้วยวิธี Soxhlet หากต้องการทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเพิ่มเติม เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่สูง นอกจากนี้อาจนำไปต่อยอดในการพัฒนาเป็นตำรับยาควบคู่กับสมุนไพรชนิดอื่นที่มีฤทธิ์เช่นเดียวกัน เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อชุมชน และส่งเสริมการใช้สมุนไพรพื้นบ้านในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. กรมกิจการผู้สูงอายุ. ข้อมูลสถิติจำนวนผู้สูงอายุประเทศไทย ปี 2561. 2561 [cited 2020 May 13]. Available from: <http://www.dop.go.th/th/know/1/153>.
2. จินห์วรา สุขสะอาด, ทิพานัน ทิพย์รักษา, รจเรศ หาญรินทร์, ปาริโมก เกิดจันทิก, สายทิพย์ สุทธิรักษา. ผลการบริบาลทางเภสัชกรรมในผู้ป่วยนอกโรคสมองเสื่อม: การศึกษานำร่อง. Thai J Pharm Prac. 2020;10(1):129-41.
3. ลักษณะ อินทร์กลับ. เข้าใจและเข้าถึงผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์. วารสารมหาวิทยาลัยคริสเตียน. 2557;20:367-525.
4. Tonnesen, E., Trushina, E. Oxidative stress, synaptic dysfunction and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2017;57(4):1105-21.
5. Klugman, A., Naughton, D., Isaacs, M., Shah, I., Petroczib, A., Tabeta, N. Antioxidant enzymatic activities in Alzheimer's disease: the relationship to acetylcholinesterase inhibitors. J Alzheimers Dis. 2012;30(3):467-74.
6. ชัชวาลย์ ช่างทำ. โรคอัลไซเมอร์ของผู้สูงอายุกับทางเลือกบำบัดด้วยสมุนไพรขึ้น. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2560;3:88-101.
7. Sahardi, N.F.N.M., Suzana, M. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) in the prevention of ageing and degenerative diseases: Review of current evidence. Evid.-Based Complementary Altern. Med 2019 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2019/5054395/>.
8. Cui, H., Zhang, B., Li, G., Li, L., Chen, H., Qi, J., et al. Identification of a quality marker of vinegar-processed *Curcuma zedoaria* on oxidative liver injury 2019 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600333/pdf/molecules-24-02073.pdf>.
9. Jitsanong, T., Khanobdee, K., Piyachaturawat, P., Wongprasert, K. Diarylheptanoid 7-(3, 4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death. Toxicol. In Vitro 2011 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233310002729?via%3Dihub>.
10. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ว่านหมาว้อ 2553 [cited 2020 June 3]. Available from: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=145>.
11. 108 พรรณไม้ไทย. ว่านชักมดลูก [cited 2020 22 Nov]. Available from: https://www.panmai.com/Warn/Warn_ZINGIB_08.shtml.

12. กนกพร อะทะวงษา. ว่านชักมดลูก...สมุนไพรวัยทอง. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2018 [cited 2020 November 21]. Available from: http://medherbguru.gpo.or.th/articles/d54_Curcuma.pdf.
13. ชिरดา สุขธรรม. ความแตกต่างของว่านชักมดลูกตัวเมียและตัวผู้ [cited 2020 22 Nov]. Available from: http://medherbguru.gpo.or.th/articles/d54_Curcuma.pdf.
14. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ขมิ้นอ้อย 2553 [cited 2020 June 3]. Available from: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=151>.
15. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ขมิ้นอ้อย 2561 [cited 2020 June 3]. Available from: <http://www.herbalcitysanuk.com/wp-content/uploads/2018/07/.pdf>.
16. Merry, J.J. ว่านเหลียง [cited 2020 22 Nov]. Available from: <https://medthai.com>.
17. ชัชวาลย์ ช่างทำ. โรคอัลไซเมอร์ของผู้สูงอายุกับทางเลือกบำบัดด้วยสมุนไพรขมิ้นชัน Alzheimer's disease of the elderly with alternative therapy by *Curcuma longa* L. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2560;3(2):88-101.
18. อารี ตัณฑ์เจริญรัตน์. โรคอัลไซเมอร์ ALZHEIMER DISEASE. วารสารศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2553;12(2):169-82.
19. ปริญญา ปั่นพล. Alzheimer's disease. บทความวิชาการสำหรับการศึกษาต่อเนื่อง สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 2562 [cited 2020 November 21]. Available from: https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=666.
20. จิราภรณ์ รังผึ้ง, รัชนิศกคา ฉุยฉาย, สุจิรา มุกดา, จินตนา ศิริวราศัย, ภัทรนา แซ่จิ้ว, ศุภนาถ ศรีศาลา, et al. ผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะขามหวานและกล้วยไข่ต่อการเกิดพิษจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ประสาทมนุษย์ชนิด SH-SY5Y. วารสารพิษวิทยาไทย. 2561;33(2):63-81.
21. อธิป สกฤตเพ็ญ. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ 2559 [cited 2020 June 3]. Available from: https://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2551/biol0451tp_ch2.pdf.
22. Nimse, S.B., Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms 2015 [cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ra/c4ra13315c#ldivAbstract>.
23. Cornelli, U. Antioxidant use in nutraceuticals. Clinics in Dermatology. 2009;27(2):175-94.
24. Li, H., Horke, S., Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. Trends Pharmacol Sci. 2013;34(6):313-9.

25. อธิป สกุลเพือก. แหล่งของ ROS เกิดขึ้นจากภายในและนอกร่างกาย และแสดงถึงสมดุลของระบบ antioxidant [cited 2021 10 March]. Available from:
<https://ccpe.pharmacycouncil.org/showfile.php?file=204>.
26. อธิป สกุลเพือก. สาเหตุของการเกิด ROS ในและนอกร่างกาย 2559 [cited 2020 June 3]. Available from: <https://ccpe.pharmacycouncil.org/showfile.php?file=204>.
27. Rahman, A., Afroz, M., Islam, R., Islam, K.D., Hossain, M.A., Na, M. In vitro antioxidant potential of the essential oil and leaf extracts of *Curcuma zedoaria* Rosc. J. Appl. Pharm. Sci. 2014;4(02):107-11.
28. Mau, J.L., Lai, E.Y.C., Wang, N.P., Chen, C.C., Chang, C.H., Chyau, C.C. Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. Food Chem. 2003;82(4):583-91.
29. Jariyawat, S., Kigpituck, P., Suksen, K., Chuncharunee, A., Chaovanalikit, A., Piyachaturawat P. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by *Curcuma comosa* Roxb. ethanol extract. J. Nat. Med. 2009;63:430-6.
30. Jitsanong, T., Khanobdee, K., Piyachaturawat, P., Wongprasert, K. Diarylheptanoid 7-(3,4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death. Toxicol In Vitro. 2011;25(1):197-76.
31. Boonmee, A., Srisomsap, C., Karnchanatat, A., Sangvanich, P. An antioxidant protein in *Curcuma comosa* Roxb. Rhizomes. Food Chem. 2011;124(2):476-80.
32. Ahmed, T., Gilani, A.H. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in alzheimer's disease. Pharmacol Biochem Behav. 2009;91(4).
33. Lupreechaset, S., Phivthong-ngam, L., Niwattisaiwong, N., Pongshompoo, S., Piyachaturawat, P., Suksamran, A., et al. Effects of *Curcuma comosa* extracts on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in male rat's brain. J. Health Res. 2016;30(2):115-21.
34. Chen, C.C., Chen, Y., His, Y.T., Chang, C.S., Huang, L.F., Ho, C.T., et al. Chemical constituents and anticancer activity of *Curcuma zedoaria* Roscoe. essential oil against non-small cell lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. J Agric Food Chem. 2013;61:11418-27.

35. Hamdi, O.A.A., Rahman, S.N.S.A., Awang, K., Wahab, N.A., Looi, C.Y., Thomas, N.F., *et al.* Cytotoxic constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. Sci. World J. 2014;2014:1-22.
36. Su, J., Sripanidkulchai, K., Wyss, JM., Sripanidkulchai, B. *Curcuma comosa* improves learning and memory function on ovariectomized rats in a long-term morris water maze test. Ethnopharmacol. 2010 130(1):70-5.
37. Sodsai, A., Piyachaturawat, P., Sophasan, S., Suksamrarn, A., Vongsakul, M. Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. Int. 2007;7(4):524-31.
38. Weerachayaphorn, J. , Chuncharune, A., Jariyawat, S., Lewchalermwong, B., Amonpatumrat, S., Suksamrarn, A., *et al.* Protection of centrilobular necrosis by *Curcuma comosa* Roxb. in carbon tetrachloride-induced mice liver injury. J Ethnopharmacol. 2010;129(2):254-60.
39. Jariyawat, S., Thammapratip, T., Suksen, K. Wanitchakool, P., Nateewattana, J., Chairoungdua, A., *et al.* Induction of apoptosis in murine leukemia by diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. Cell Biol Toxicol. 2011;27:413-23.
40. ชिरดา สุขธรรม. การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยด้วย chromatographic fingerprints. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2557;194.
41. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสชนะพันธุ์, ประไพ วงศ์สินมั่นคง. ทีแอลซี : วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2554.
42. Department of Medical Sciences MoPH. Thai Herbal Pharmacopoeia 2019. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Ltd; 2019.
43. วาทีนี เสงี่ยมราษฎร์. การสกัด การตรวจสอบสารพฤษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2559.
44. นงลักษณ์ ห้วยหงษ์ทอง. การทดสอบสารพฤษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2559.
45. ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์. สารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชักมดลูกที่จำหน่ายในท้องตลาดของไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2560;19.
46. Malipeddi, H., Ranjitha, A., Anand, M., Karigar, A., Ramana, D.M. Phytochemical screening and antioxidant activity of rhizome part *Curcuma zedoaria*. Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 2010;1(2):414-7.

47. Azam, G., Noman, S., Al-Amin, MM. Phytochemical screening and antipyretic effect of *Curcuma zedoaria* Rosc. (Zingiberaceae) rhizome 2013 [cited 2021 26 March]. Available from: http://www.sdiarticle1.org/prh/BJPR_14/2014/Revised-manuscript_version1_7225.pdf.
48. Chiu, C.M., Nootem, J., Santiwat, T., Srisuwannaket, C., Pratumyot, K., Lin, W.C., *et al.* Enhanced stability and bioactivity of *Curcuma comosa* Roxb. extract in electrospun gelatin nanofibers. *Electrospun polymer nanofibers for food and health applications*. 2019:1-12.
49. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. Phenolic compounds / สารประกอบฟีนอล [cited 2020 Jun 3]. Available from: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compounds>.
50. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006;99(1):191-203.
51. Pietta. กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2000 [cited 2020 Nov 19]. Available from: https://research.psu.ac.th/files/res_che2553/resche_files/575_chapter2.pdf.
52. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลิก [Available from: https://research.psu.ac.th/files/res_che2553/resche_files/575_chapter2.pdf.
53. Samarasinghe, B., Kaliyadasa, E., Marasinghe, P. Investigation of bioactivities and physicochemical properties of four different *Curcuma* species available in Sri Lanka. *JMPB*. 2020:1-9.
54. Akter, J., Hossain, M.A., Takara, K., Islam, M.Z., Hou, D.X. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. *COMP BIOCHEM PHYS C*. 2019;215:9-17.
55. Burapan, S., Kim, M., Paisooksantivatana, Y., Eser, B.E., Han, J. Thai *Curcuma* species: antioxidant and bioactive compounds. *Foods*. 2020;2(9):1219.
56. Nimse, S.B., Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 2015(35).
57. วิภพ สุทนต์. Anticancer activities of flavonoids: mechanisms of actions ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์. *บทฟื้นฟูวิชาการ Review Article*. 2013;28.
58. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035-42
59. Akter, J., Hossain, M.A., Takara, K., Islam, M.Z., Hou, D.X. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. *COMP BIOCHEM PHYS C*. 2019;215:9-17.

60. Tuy-on, T. , Itharat, A. , Maki, P., Thongdeeying, P., Pipatrattanaseree, W., Ooraikul, B. *In vitro* cytotoxic activity against breast, cervical, and ovarian cancer cells and flavonoid content of plant ingredients used in a selected Thai traditional cancer remedy: correlation and hierarchical cluster analysis. eCAM. 2020;2020:10.
61. ขวัญชนก เหมียนอก. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยาผสมโคคลาน: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2562.
62. กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ, ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2560;3(1). (62)
63. Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J.,Borges, F. กลไกการเกิดปฏิกิริยา DPPH radical scavenging [cited 2020 5 Nov]. Available from:
https://www.researchgate.net/profile/Alexandra_Gaspar/publication/255976992_Hydroxycinnamic_Acid_Antioxidants_An_Electrochemical_Overview/.
64. Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R. กลไกการเกิดปฏิกิริยา ABTS radical scavenging [cited 2020 5 Nov]. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1002/fft2.10?download=true>.
65. National Center for Biotechnology Information. โครงสร้างสารมาตรฐาน trolox [cited 2020 22 Nov]. Available from:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox#section=Information-Sources>[http://kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_byval/ag_16_in_1.2.7_99\(2559\).pdf](http://kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_byval/ag_16_in_1.2.7_99(2559).pdf).
66. Tomasina, F., Carabio, C., Celano, L. and Thomson, L. กลไกการเกิดปฏิกิริยา FRAP radical scavenging [cited 2020 11 Oct]. Available from:
<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.20617>.
67. NGThai. เอนไซม์ (Enzyme) 2019 [cited 2020 20 Nov]. Available from:
<https://ngthai.com/science/14770/definition-enzyme/>.
68. อนุสรณ์ เชิดทอง. ความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ 2019 [cited 2021 15 March]. Available from: <https://ag2.kku.ac.th/eLearning/137748/Doc/Chapter%206%20Enzymes.pdf>.
69. ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม, อธิภัทร นวลน้อย. แนวทางใหม่ในการพัฒนาสารยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 2554;6(2):157-73.

70. อนุสรณ์ เชิดทอง. ความจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ที่อธิบายได้ด้วยทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ [cited 2021 10 March]. Available from:
<https://ag2.kku.ac.th/eLearning/137748/Doc/Chapter%206%20Enzymes.pdf>.
71. Ni, P., Sun, Y., Dai, H., Jiang, S., Lu, W., Wang, Y., *et al.* Colorimetric assay for acetylcholinesterase and inhibitor screening based on the Ag [I] ion-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). *Sens. Actuators B Chem.* 2016;226:104-9.
72. Xu, Z. การสลาย acetylcholine ด้วยเอนไซม์ AChE หรือ BChE [cited 2021 10 March]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030508006910>.
73. Liao, S., Han, W., Ding, H., Xie, D., Tan, H., Yang, S., *et al.* Modulated dye retention for the signal-on fluorometric determination of acetylcholinesterase inhibitor. *Anal Chem.* 2013;85(10):4968-73.
74. Ni, P. การจางลงของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิไดซ์ระหว่าง Ag [I] ion กับ tricholine [cited 2021 13 March]. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400515306638>.
75. Ali-shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Abuzaitoun, S.Y., Qasem, I.B. *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *FFHD.* 2014;4(9):381-400
76. Liao, S. การเรืองแสงของ squaraine ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส [cited 2021 13 March]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597308/>
77. Ayoola, G.A., Coker, H., Adesegun, S., Adepoju-Bello, A., Obaweya, K., Ezennia, E., *et al.* Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *TROP J PHARM RES.* 2008;7(3):1019-24.
78. Jamous, R.M. กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง thiocholine และ DTNB ในการทดสอบวิธี Ellman's method [cited 2021 13 March]. Available from:
https://www.researchgate.net/figure/Chemical-mechanism-of-Ellmans-method_fig1_265231301.
79. นงลักษณ์ ห้วยหงษ์ทอง. การทดสอบสารพิษทุกเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2559.
80. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์, ศศิภาวรรณ มาชะนา, จิราพร จรอนันต์, นกัสนัน ฉันทอำรังศิริ, บัลลังก์ เนื่องแสง. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ องค์ประกอบทางเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ

พังกาดอกข่อย (*Bruguiera hainesii*) และหลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2560.

81. สุพัตร ห้างยาหน่าย, ประภาพร จันทรเียด, จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์.ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทยบางชนิดในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว (Srinakharinwirot Science Journal). 2560;33:1-12.

82. สุพัตร ห้างยาหน่าย. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสจากผักในครัวเรือน: มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา; 2559.

83. ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์. สารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชักมดลูกที่จำหน่ายในท้องตลาดของไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2560;1:21.

84. Sandrasari, D.A. Determination of potential level of Indonesian rhizomes as an antioxidant based on phenolic compound and antioxidant activity. EES. 2019;383:12-7.

85. Burapan, S., Kim, M., Paisooksantivatana, Y., Eser, B.E., Han, J. Thai *Curcuma* species: antioxidant and bioactive compounds. Foods. 2020;9(9):1219.

86. Randerath, K. Thin-Layer Chromatography. Berlin-Heidelberg-NewYork: Springer Verlag; 1965.

87. ขาญชัย สาดแสงจันทร์. รายงานการวิจัยเรื่องการตรวจสอบพิษเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบโคกกะอ่อม. [cited 2021 22 Feb]. Available from: <http://dc.oas.psu.ac.th/dcims/files/03995/appen.pdf>.

88. John, A. How does anisaldehyde sulphuric acid reagent yield different colours in TLC during derivatisation 2014 [cited 2021 26 March]. Available from: https://www.researchgate.net/post/How_does_anisaldehyde_sulphuric_acid_reagent_yield_different_colours_in_TLC_during_derivatisation.

89. Agatonovic-Kustrin, S., Kustrin, E., Gegechkori, V., Morton, D.W. High-performance thin-layer chromatography hyphenated with microchemical and biochemical derivatizations in bioactivity profiling of marine species. Mar Drugs. 2019;17(3):148.

90. Myint, K.T.Y., Mar, T.S., Myint, M.M.S., Myint, M.M., Win, P.P., Khine, M.M., *et al.* Comparative study of active curcumin content from four *curcuma* species in Myanmar. MHSR. 2018;30:1-7.

91. Srivastava, N.R., Lal, B.R., Kumar, S.V. Physicochemical and phytochemical investigation of three different species of *Curcuma* rhizome. Int. Res. J. Pharm. 2013;4(3):163-6

92. Tan, P.V. The determination of total alkaloid, polyphenol, flavonoid and saponin contents of pogang gan (*Curcuma sp.*). Biol. 2018;10(4).
93. Rungsaeng, P., Sangvanich, P., Karnchanatat, A. Protein with acetylcholinesterase inhibitory activity from the rhizomes of Zingiberaceae plants 2011. [cited 2021 20 March]. Available from: <https://gsbooks.gs.kku.ac.th/54/grc12/files/bmp4.pdf>.

ภาคผนวก

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากว่านเหลิ้งและ
ว่านชักมดลูก

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน(อ./ดร./ผศ./รศ./ศ) ภญ.ดร.ขวัญชฎานวิศ มาชนะนา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 เมษายน 2563 ถึงวันที่ 2 เมษายน 2564

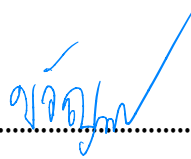
ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2563 ถึงวันที่ 2 เมษายน 2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100 %) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2564

รายจ่าย

รายงาน	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าสารเคมี	7,800 บาท	7,800 บาท	0 บาท
2. ค่าใช้สอย	500 บาท	500 บาท	0 บาท
3. ค่าโปสเตอร์	200 บาท	200 บาท	0 บาท
4. ค่าพิมพ์เอกสาร	500 บาท	500 บาท	0 บาท
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	-	-	-
รวม	9,000 บาท	9,000 บาท	0 บาท

(..........)

ภญ.ดร.ขวัญชฎานวิศ มาชนะนา

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย